



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

FELIPE RODRIGUES DE MATOS

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS
MMP-9, VEGF E FvW EM LESÕES CENTRAIS E
PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES**

**NATAL / RN
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FELIPE RODRIGUES DE MATOS

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS
MMP-9, VEGF E FvW EM LESÕES CENTRAIS E
PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Oral.

Orientadora: Roseana de Almeida Freitas

**NATAL / RN
2010**

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia
Biblioteca Setorial de Odontologia “Profº Alberto Moreira Campos”.

Matos, Felipe Rodrigues de.

Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-9, VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes / Felipe Rodrigues de Matos. – Natal, RN, 2009.

103 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas.

Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral.

1. Imuno-Histoquímica – Dissertação. 2. Células Gigantes – Dissertação. 3. Lesão Periférica de Células Gigantes – Dissertação. I. Freitas, Roseana de Almeida. II. Título.

RN/UF/BSO

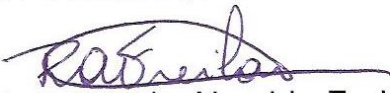
Black D65

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 12 de fevereiro de 2010, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. João Luiz de Miranda
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri


Profa. Dra. Lélia Batista de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte


Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus pais!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

No momento em que decidi sair de Minas Gerais e vim ao Rio Grande do Norte aperfeiçoar minha vocação ao magistério, através do curso de Mestrado em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sabia que tinha feito uma feliz escolha. Por isso, gostaria de agradecer antes, ao meu amigo e professor João Luiz de Miranda, que desde os tempos de graduação incentivou-me e guiou os meus passos para eu perseverar na vida acadêmica.

À professora Dra. Roseana de Almeida Freitas pela sua doce sabedoria e paciência em orientar seu pequeno discípulo.

Ao grupo de professores da Patologia Oral da UFRN: Dra. Ana Miryam Costa de Medeiros, Dr. Ângelo Roncalli, Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa, Dra. Érika Janine Silveira Dantas, Dra. Hébel Cavalcanti Galvão, Dr. Kênio Costa Lima, Dr. Leão Pereira Pinto, Dra. Lélia Batista de Souza, Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz, Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel e Dra. Sílvia Batistuzzo. Agradeço por terem compartilhado comigo momentos saudáveis de convivência e transmitido com esmero e dedicação o conhecimento.

A Gracinha, Canindé, Hevio e Sandrinha pelo convívio amigável e atenção prestada.

A todos meus amigos da pós-graduação: Adriana, Águida, Alessandra, Alexandre, Ana Rafaela, Bruna Amaral, Bruna Rafaela, Cassiano, Cyntia, Déborah, Emeline, George, Joabe, Karuza, Maiara, Marcelo, Marianne, Manuel, Pedro Paulo, Pollianna, Thaís e Valéria. Meu sincero agradecimento a vocês pela amizade, auxílio e palavras de otimismo e confiança.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

RESUMO

Lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG) dos maxilares possuem um comportamento clínico distinto, embora compartilhem características histopatológicas semelhantes. Ainda é obscuro se essas diferenças clínicas são apoiadas por um padrão distinto de imunexpressão de marcadores para células gigantes multinucleadas (CG) e mononucleadas (CM). O escopo do presente trabalho foi realizar um estudo imuno-histoquímico comparativo, analisando quantitativamente células gigantes multinucleadas e mononucleadas imunorreativas à MMP-9 e ao VEGF e mensurar a vascularização através do FvW para verificar se há ou não diferenças de expressão desses biomarcadores entre as LCCG e LPCG. Foram selecionados 20 casos de LCCG e 20 de LPCG emblocados em parafina. Constatou-se diferença significativa ($p < 0.05$) em relação à imunorreatividade na CM para MMP-9 e VEGF nas LPCG, sendo a MMP-9 mais expressa. O VEGF foi mais expresso nas CM das LCCG em relação às LPCG ($p < 0.05$), assim como sua expressão global ($p < 0.05$). A MMP-9 apresentou uma tendência maior de expressão nas LCCG, embora não significativa estatisticamente ($p > 0.05$). Na mensuração dos vasos através da contagem microvascular (MVC), verificou-se maior MVC nas LPCG do que nas LCCG ($p < 0.05$). Testou-se correlação entre as proteínas estudadas em cada grupo de lesões e constatou-se uma correlação negativa significativa entre VEGF e FvW nas LCCG ($p < 0.05$). Diante dos achados deste estudo, observa-se que há diferença na expressão do VEGF nas CM, bem como na expressão global entre as lesões. Observou-se uma tendência na maior expressão da MMP-9 nas LCCG, embora não significativa estatisticamente. Dessa forma, sugere-se que a maior expressão de ambas as proteínas nas LCCG esteja mais relacionada possivelmente com a osteoclastogênese. Adicionalmente, os resultados do presente estudo apontam um maior grau de vascularização nas LPCG quando comparadas com as LCCG, fato este que pode estar relacionado diretamente com a natureza reacional das primeiras, em que o processo inflamatório com sua rica angiogênese contribui sobremaneira para estes achados.

Palavras-chave: Lesão periférica de células gigantes. Lesão central de células gigantes. Imuno-histoquímica. MMP-9. VEGF.

ABSTRACT

ABSTRACT

Central giant cell lesion (CGCL) and peripheral giant cell lesion (PGCL) of the jaws have a distinct clinical behavior, although they share histopathologic features. It is still unclear whether these clinical differences are supported by a distinct pattern of immunoeexpression of markers for multinucleated giant cells (GC) and mononuclear cells (MC). The purpose of this study was to compare the immunohistochemical expression of VEGF, MMP-9 in CG and MC and measure the vascularization by vWF to check whether there are differences in expression of these biomarkers between CGCL and PGCL. Paraffin wax blocks of 20 cases of LCCG and 20 LPCG were retrieved. MMP-9 immunoreactivity was greater in the CM of PGCL compared to VEGF ($p<0.05$). VEGF expression was greater in the CM of CGCL compared to PGCL ($p<0.05$) and it was greater in the overall expression of CGCL compared to PGCL ($p<0.05$). Vascularity was quantified by microvascular counting (MVC). MVC was greater in the PGCL compared CGCL ($p<0.05$). MMP-9 showed a greater tendency of expression in CGCL, though was not significant ($p>0.05$). We tested correlation between the proteins studied in each group and found a significant negative correlation between VEGF and vWF in CGCL ($p<0.05$). These results suggest that there are differences in the expression of VEGF in CM and overall expression between the lesions, although no statistically significant difference in the overall expression of the MMP-9. Then, there was a trend in increased expression of MMP-9 and VEGF in CGCL, possibly by the involvement of both proteins in osteoclastogenesis. Additionally, the results of this study indicate a higher degree of vascularization in PGCL compared to CGCL, fact that can be directly linked to the reactive nature of the PGCL, where the inflammatory process with its rich angiogenesis contributes significantly to these findings.

Key-words: Peripheral giant cell lesion. Central giant cell lesion. Immunohistochemistry. MMP-9. VEGF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 1 – | Expressão imuno-histoquímica da MMP-9 em lesão central de células gigantes evidenciada em citoplasma de células multinucleadas e células mononucleadas e em células endoteliais. LSAB (400X). | 60 |
| FIGURA 2 – | Expressão imuno-histoquímica do VEGF em lesão central de células gigantes evidenciada em citoplasma de células multinucleadas e células mononucleadas. LSAB (400X). | 60 |
| FIGURA 3 – | Expressão imuno-histoquímica do VEGF em lesão central de células gigantes evidenciada em citoplasma de células multinucleadas, células mononucleadas e células endoteliais. LSAB (400X). | 61 |
| FIGURA 4 – | Expressão imuno-histoquímica do FvW em lesão central de células gigantes, marcando células endoteliais. LSAB (400X). | 61 |
| FIGURA 5 – | Expressão imuno-histoquímica da MMP-9 em lesão periférica de células gigantes vista em citoplasma de células multinucleadas e células mononucleadas. LSAB (400X). | 65 |
| FIGURA 6 – | Células endoteliais, células multinucleadas e mononucleadas imunorreativas à MMP-9 em lesão periférica de células gigantes. LSAB (400X). | 65 |
| FIGURA 7 – | Expressão imuno-histoquímica do VEGF em lesão periférica de células gigantes no citoplasma de células multinucleadas, células mononucleadas e em células endoteliais. LSAB (400X). | 66 |
| FIGURA 8 – | Expressão imuno-histoquímica do FvW em lesão periférica de células gigantes, marcando células endoteliais. LSAB (400X). | 66 |
| QUADRO 1 – | Frequências referentes ao gênero, raça e sítio anatômico dos casos de lesão central e periférica de células gigantes. | 49 |
| QUADRO 2 – | Especificidade do anticorpo, clone, diluição, fabricante, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico. | 52 |

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|---|----|
| TABELA 1 – | Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-MMP-9 e -VEGF quanto ao tipo celular em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 58 |
| TABELA 2 – | Distribuição da MVC para o anticorpo anti-FvW em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 59 |
| TABELA 3 – | Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-MMP-9 e -VEGF quanto ao tipo celular em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 63 |
| TABELA 4 – | Distribuição da MVC para o anticorpo anti-FvW em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 64 |
| TABELA 5 – | Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-MMP-9 e -VEGF em lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010 | 68 |
| TABELA 6 – | Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para o VEGF, segundo o tipo celular em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 69 |
| TABELA 7 – | Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para o VEGF, segundo o tipo celular em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 69 |
| TABELA 8 – | Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para as mononucleadas (CM), segundo o tipo de marcador em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 70 |
| TABELA 9 – | Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para as mononucleadas (CM), segundo o tipo de marcador em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010 | 70 |
| TABELA 10 – | Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores do percentual de células imunorreativas para a MMP-9 e o VEGF, segundo o tipo celular entre lesões centrais de células gigantes (LCCG) e lesões periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010 | 71 |

- TABELA 11 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para MMP-9, VEGF e FvW entre lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010 72
- TABELA 12 – Valores do teste de Sperman para avaliar as correlações dos escores de células imunorreativas para a MMP-9 e o VEGF e da contagem microvascular de vasos imunorreativos ao FvW, em lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010 73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- bFGF** – fator de crescimento fibroblástico básico; do inglês *basic fibroblast growth factor*;
- CG** – célula gigante multinucleada;
- CM** – célula mononucleada;
- CTGF** – fator de crescimento do tecido conjuntivo; do inglês *connective tissue growth factor*;
- EP** – escore do percentual de células coradas;
- FGF** – fator de crescimento fibroblástico; do inglês *fibroblast growth factor*;
- FvW** – fator de Von Willebrand;
- G-CSF** – fator estimulador de granulócitos; do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*;
- HGF** – fator de crescimento dos hepatócitos; do inglês *hepatocyte growth factor*;
- IL** – interleucina;
- LCA** – antígeno leucocitário comum;
- LCCG** – lesão central de células gigantes;
- LPCG** – lesão periférica de células gigantes;
- M-CSF** – fator estimulante de colônia de macrófago; do inglês *macrophage colony-stimulating factor*;
- MEC** – matriz extracelular;
- MMP** – metaloproteinase de matriz;
- MVC** – contagem microvascular;
- MVD** – densidade microvascular;
- MVV** – volume microvascular;
- PDGF** – fator de crescimento derivado de plaqueta; do inglês *platelet-derived growth factor*;
- PGF** – fator de crescimento placentário; do inglês *placent growth factor*;
- RANKL** – receptor ativador do fator ligante nuclear κ B; do inglês *receptor activator of NF-kappaB ligand*;
- TCG** – tumor de célula gigante;
- TGF- α** – fator alfa de crescimento transformante; do inglês *transforming growth factor*;
- TGF- β** – fator beta de crescimento transformante; do inglês *transforming growth factor*;
- Tie-2** – receptor angiopoetina
- TIMP** – inibidor tecidual específico das metaloproteinases; do inglês *tissue inhibitor of metalloproteinases*;

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa; do inglês *tumor necrosis factor*;

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular; do inglês *vascular endothelial growth factor*;

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 24 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 27 |
| 2.1 Considerações gerais | 27 |
| 2.2 Lesão central de células gigantes | 28 |
| 2.3 Lesão periférica de células gigantes | 30 |
| 2.4 Patogenia | 31 |
| 2.5 Matriz extracelular (MEC) | 33 |
| 2.6 Metaloproteinasas da matriz extracelular (MMPs) | 35 |
| 2.6.1 MMP-9 | 37 |
| 2.7 Angiogênese | 40 |
| 2.7.1 Fator de crescimento vascular endotelial | 43 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 46 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 4.1 Caracterização do estudo | 48 |
| 4.2 População | 48 |
| 4.3 Amostra | 48 |
| 4.3.1 Caracterização da amostra | 48 |
| 4.4 Critérios de seleção da amostra | 49 |
| 4.4.1 Critérios de inclusão | 49 |
| 4.4.2 Critérios de exclusão | 49 |
| 4.5 Estudo imuno-histoquímico | 50 |
| 4.5.1 Coloração pelo método imuno-histoquímico | 50 |
| 4.5.2 Análise imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF..... | 52 |
| 4.5.3 Análise imuno-histoquímica do FvW | 53 |
| 4.6 Análise estatística | 54 |
| 4.7 Implicações éticas | 55 |
| 5 RESULTADOS | 57 |
| 5.1 Resultados imuno-histoquímicos | 57 |
| 5.1.1 Lesão central de células gigantes | 57 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.2 Lesão periférica de células gigantes | 62 |
| 5.1.3 Expressão global da MMP-9 e do VEGF nas LCCG e LPCG | 67 |
| 5.2 Resultados estatísticos | 68 |
| 6 DISCUSSÃO | 75 |
| 7 CONCLUSÃO | 84 |
| REFERÊNCIAS | 86 |
| APÊNDICES..... | 95 |
| APÊNDICE A – Ficha para coleta de dados LCCG | 95 |
| APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados LPCG | 96 |
| APÊNDICE C – Ficha para anotação das células imunopositivas/total de células ... | 97 |
| APÊNDICE D – Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica do FvW | 98 |
| APÊNDICE E – Parâmetros utilizados no cálculo do percentual de CG e CM | 99 |
| positivas ao VEGF e MMP-9 nas LCCG | |
| APÊNDICE F – Parâmetros utilizados no cálculo do percentual de CG e CM | 100 |
| positivas ao VEGF e MMP-9 nas LPCG | |
| APÊNDICE G – Parâmetros utilizados no cálculo do percentual global de células | 101 |
| positivas ao VEGF e MMP-9 nas LCCG e LPCG | |
| ANEXOS | 103 |
| ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa, UFRN | 103 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO*

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão óssea reacional constituída por células gigantes multinucleadas em um estroma de células mesenquimais ovóides a fusiformes que tende a ocorrer na porção anterior da mandíbula em pacientes jovens do gênero feminino. Possui um comportamento clínico variável desde crescimento lento, assintomático, sem recorrência até crescimento rápido, doloroso e recorrente (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000).

A lesão periférica de células gigantes (LPCG) é uma lesão reacional e possui características histológicas semelhantes à LCCG e, geralmente, está associada a um fator irritante local. A LPCG tem uma baixa recorrência, principalmente se eliminado o fator irritante local (GOMES et al., 2007).

Embora a LCCG e a LPCG sejam histologicamente semelhantes, observam-se diferenças clínicas no tocante ao comportamento. Não está claro se a LPCG é uma entidade distinta ou uma variante da LCCG. Esforços têm sido feitos para avaliar se essas diferenças são apoiadas por um padrão distinto de imunexpressão de marcadores para células gigantes multinucleadas (CG) e as mononucleadas (CM) das lesões. No entanto, é difícil obter conclusões firmes, porque o número de estudos sobre as diferenças entre essas lesões é muito limitado. Além disso, não só a histogênese das CM, mas também o mecanismo pelo qual se acumulam e contribuem para a osteólise que ocorre quando surgem as lesões, quer dentro ou adjacente ao osso, ainda são controversos (FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

Diversos biomarcadores têm sido associados em outras pesquisas para auxiliar o entendimento de lesões, destacando-se as metaloproteinases de matriz (MMPs) e fatores angiogênicos. Dentre estes, a MMP-9 e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) têm sido analisados em granulomas periapicais, cistos radiculares e residuais (RUIZ, 2008), tumores de células gigantes (KUMTA et al., 2003) e câncer de mama (JOBIM et al., 2008), sendo relacionados, respectivamente, a eventos angiogênicos, osteoclastogênicos e potencial metastático.

*Trabalho de Dissertação segundo a normalização realizada pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT-NBR 14724:2002; NBR 10520:2002)

Não há na literatura científica trabalhos comparando expressão imuno-histoquímica da MMP-9, do VEGF e do fator de Von Willebrand (FvW) entre LCCG e LPCG, destacando-se assim o caráter inédito do estudo. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo imuno-histoquímico comparativo, analisando quantitativamente células gigantes multinucleadas e células mononucleadas imunorreativas ao VEGF e à MMP-9 e mensurar a vascularização através do FvW para verificar se há ou não diferenças de expressão desses biomarcadores entre as LCCG e LPCG.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais

Lesões de células gigantes são lesões proliferativas não neoplásicas que ocorrem na boca e no complexo maxilo-mandibular, basicamente de natureza inflamatória, tendo como sede o periodonto, e manifestam-se clinicamente por crescimentos teciduais, sem características histológicas tumorais. Caracterizam-se pela presença de grande número de células gigantes multinucleadas em meio a seu estroma (FLÓREZ-MORENO et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2004). A natureza dessas células multinucleadas tem sido exaustivamente investigada, principalmente pela técnica imuno-histoquímica. Alguns estudos demonstram imunorreatividade para o CD68 e o antígeno comum leucocitário (LCA), sugerindo que as células gigantes multinucleadas são derivadas da medula óssea e membros da linhagem histiócito/macrofágica (ARAGÃO et al., 2007; DOUSSIS; PUDDLE; ATHANASOU, 1992; FLÓREZ-MORENO et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2004), bem como da linhagem osteoclástica por terem identificado a fostase ácida tártaro-resistente nessas células (ITONAGA et al., 2003; TIFEE; AUFDEMORTE, 1997).

A origem exata das lesões de células gigantes ainda permanece incerta; provavelmente, originam-se do ligamento periodontal, mucoperiósteo ou centralmente no osso (CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007; FLÓREZ-MORENO et al., 2008). Essas lesões podem ocorrer tanto em localizações intra-ósseas (centrais), quanto em tecidos moles (periféricas) na cavidade oral. Acredita-se que os traumas tenham importância considerável na etiologia das mesmas, sendo a causa principal a extração dentária, embora outros fatores, como irritação provocada por prótese total ou simples infecção crônica, possam também ter significado. Ambas são semelhantes histologicamente, caracterizadas pela presença de inúmeras células gigantes multinucleadas. Porém, estas lesões apresentam um comportamento clínico distinto (FLÓREZ-MORENO et al., 2008; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000).

A natureza das lesões de células gigantes ainda é alvo de discussão. Várias hipóteses são encontradas na literatura científica, variando desde uma lesão de natureza reacional a um processo neoplásico (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). Há ainda a sugestão de alguns autores da lesão ser de natureza proliferativa vascular (COLLINS, 2000; KABAN et al., 2002).

Souza, Mesquita e Gomez (2000) avaliaram marcadores relacionados à atividade mitótica celular e notaram que p53 e Ki67 foram negativos à imunomarcção tanto em LPCG quanto em LCCG. Além disso, verificaram a presença de imunorreção para o MDM2, uma proteína que inibe a ação da p53 selvagem. Apesar do MDM2 ter sido expresso nesse trabalho e em outros que avaliaram sarcomas (OLINER et al., 1992), deve-se ressaltar que se observa imunomarcção também da referida proteína em lesões não neoplásicas como hiperplasia fibrosa inflamatória e em mucosa normal (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000). Assim, a agressividade da lesão não estaria associada com a atividade proliferativa celular.

A respeito da hipótese das lesões de células gigantes serem de natureza proliferativa vascular, Vered, Buchner e Dayan (2006) analisaram a expressão imuno-histoquímica do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e do fator fibroblástico básico básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*) em 41 casos de LCCG. Os autores verificaram que a angiogênese apesar de ocorrer, foi limitada. A baixa média de volume microvascular (MVV) para VEGF e bFGF (3% e 4%, respectivamente) foi notada dentro da área da lesão. Entretanto, nas áreas inflamatórias apresentaram alta média de MVV em ambos marcadores. Esses achados, segundo os pesquisadores, sugerem que a LCCG não pode ser definida como uma lesão proliferativa vascular.

2.2 Lesão central de células gigantes

A Lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão intra-óssea proliferativa não neoplásica que ocorre exclusivamente em maxila e mandíbula (BATAINEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEB, 2002; QUINDERÉ et al., 2008). A etiologia ainda é muito discutida, pois tanto fatores locais quanto sistêmicos podem estar envolvidos, além da possível associação genética aventada recentemente (CARVALHO et al., 2009). Dos fatores locais, podem ser citados o trauma e danos vasculares, que produziriam hemorragia intramedular e o tecido conjuntivo de forma exacerbada tentaria substituir o osso (FRANCO et al., 2003; ITONAGA et al., 2003; KABAN et al., 2002). Dentre as causas sistêmicas, podem-se citar a neurofibromatose I, a síndrome de Noonan e os distúrbios hormonais, como o hiperparatireoidismo e a gravidez (GOMES et al., 2007; LANGE; AKKER; BERG, 2007).

Com relação à genética, Carvalho et al. (2009) investigaram mutações no gene *SH3BP2*. Esse gene que se encontra no cromossomo 4p16.3, codifica uma proteína adaptadora SH3BP2. Uma mutação no éxon 9 do referido gene foi descrita em um caso não-familiar de querubismo (IMAI et al., 2003). Por compartilhar características histológicas com a LCCG, Carvalho et al. (2009) analisaram todas as regiões codificantes do gene *SH3BP2* e encontraram duas novas mutações, sendo uma associada a um caso esporádico de LCCG e uma associada a um paciente com querubismo. Todavia, Lietman et al. (2007) estudaram o éxon 9 do mesmo gene em nove casos de LCCG e não encontraram nenhuma alteração molecular.

A maioria dos pacientes com LCCG tem em média 30 anos de idades e é do gênero feminino, sendo a mandíbula o sítio com maior número de casos relatados. O comportamento clínico dessa lesão pode variar desde assintomático, de evolução lenta e baixa recorrência a sintomático, com reabsorção óssea e deslocamento dentário, sendo mais agressiva e com altas taxas de recorrência (FLÓREZ-MORENO et al., 2008; GOMES et al., 2007; KABAN et al., 2002; KRUSE-LOSLER; DIALLO; GAETNER, 2006; LANGE; AKKER; BERG, 2007; NOGUEIRA et al., 2004; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000).

Em uma análise epidemiológica retrospectiva recente de 58 casos de lesões de células gigantes no Brasil (GOMES et al., 2007), 61,9% dos casos de LCCG ocorreram em mulheres e 71,4% dos pacientes tinham menos de 30 anos. No tocante à localização anatômica, foi observado uma proporção de 2:1 para a mandíbula e a maioria das lesões era assintomática (80,9%). Em outro estudo realizado em Israel (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006), foi constatado também um maior número de LCCG em mulheres, cerca de 56% dos 41 casos, assim como predileção para mandíbula, mas de uma forma mais equilibrada (51%). Percebe-se, portanto, que as LCCG possuem um perfil epidemiológico de certa forma uniforme, não constatando muitas discrepâncias em sua epidemiologia

Radiograficamente, a LCCG apresenta-se como uma expansão radiolúcida, unilocular ou multilocular que geralmente é atravessada por espículas ósseas. Quando em maxila, pode invadir assoalho de órbita e seio maxilar e em mandíbula, bem como expandir e perfurar a cortical óssea com movimentação dentária ou reabsorção radicular (BATAINEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEB, 2002; GOMES et al., 2007; LANGE; AKKER; BERG, 2007; NOGUEIRA et al., 2004; SAW et al., 2009).

É comum a LCCG apresentar um estroma colagenoso, com células mesenquimais ovóides e fusiformes, com uma grande quantidade de células gigantes multinucleadas com número variável de núcleos (desde poucos até mais de doze), áreas de reabsorção óssea e

áreas de extravasamento hemorrágico (ITONAGA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2004; QUINDERÉ et al., 2008). Podem ser vistas áreas de calcificação distrófica e metaplasia óssea na periferia (LANGE; AKKER; BERG, 2007). Deve-se observar que histologicamente a LCCG e o tumor marrom do hiperparatireoidismo são similares, principalmente nos casos em que há intensa pigmentação endógena acastanhada compatível com hemossiderina. Assim, como exame complementar, é prudente solicitar níveis séricos de cálcio, fosfato, fosfatase alcalina e paratormônio, cujos valores para LCCG encontram-se normais (CAMELO, 2007; NOLETO et al., 2007).

O tratamento será guiado pelo comportamento clínico da lesão. Nos casos mais brandos, uma remoção cirúrgica com simples curetagem é o suficiente. Todavia, em casos mais agressivos, a curetagem é complementada com criocirurgia, osteotomia periférica e, em alguns casos, até uma ressecção em bloco (ARDONATO; PATICOFF, 2001). Outros tratamentos têm sido propostos como aplicação diária de calcitonina, injeção intralesional de corticosteróides e injeção sub-cutânea de interferon-alpha (BATAINEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEB, 2002; KABAN et al., 1999; LANGE; AKKER; BERG, 2007; VERED et al., 2007; SAW et al., 2009). A calcitonina aplicada em cultura de células gigantes provenientes de LCCG tem resultado na imobilidade dessas células e retração citoplasmática (ITONAGA et al., 2003).

2.3 Lesão periférica de células gigantes

A Lesão periférica de células gigantes (LPCG) é uma lesão reacional proliferativa dos tecidos moles frente a uma agressão. Acredita-se que os traumas tenham importância considerável na etiologia, sendo a causa principal a extração dentária, além de outros fatores como irritação provocada por prótese mal adaptada ou uma infecção crônica (CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007; CARLI; SILVA; PAZA, 2006; NOGUEIRA et al., 2004; QUINDERÉ et al., 2008; RESENDE et al., 2007).

A idade mais prevalente das LPCG varia entre 40 e 60 anos, com predileção pelo gênero feminino. Clinicamente, a LPCG manifesta-se como uma lesão exofítica de base sésil ou pediculada, de coloração vermelho-escura, vascular ou hemorrágica, que acomete gengiva e processo alveolar, possuindo comportamento clínico indolente e baixa taxa de recorrência comparada à LCCG (CARLI; SILVA; PAZA, 2006; GOMES et al., 2007; NOGUEIRA et al.,

2004; RESENDE et al., 2007; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000). A LPCG possui acentuado potencial de crescimento, levando, por vezes, à erosão do osso subjacente (CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007).

Ao realizar um estudo retrospectivo de 58 casos de LPCG no Brasil, Gomes et al. (2007) notaram uma distribuição equitativa dos casos em relação ao gênero na proporção de 1:1 e que 56,7% dos pacientes tinham entre 31 e 50 anos. No tocante à localização anatômica, foi observado que 62% das lesões acometeram maxila e a maioria das lesões era assintomática (86,4%). Na China, uma pesquisa semelhante realizada por Zhang et al. (2007), demonstrou que 59,4% das 2.439 LPCG acometeram mulheres e a média de idade dos casos era de 45,4 anos. Com relação ao sítio anatômico, houve uma distribuição equilibrada entre maxila e mandíbula com proporção de 1:1. A lesão apresentou-se com sangramento em 62,1% dos casos. Denota-se dessa forma que a LPCG demonstra um perfil epidemiológico de certa forma similar entre populações com localizações geográficas distintas.

Histologicamente, a lesão exibe um processo inflamatório crônico, permeando o tecido conjuntivo fibroso, com focos de hemorragia e de proliferação vascular, além da presença de células gigantes em meio às células mesenquimais ovóides fusiformes. O epitélio pode encontrar-se hiperplásico e ulcerado superficialmente. Ainda pode ocorrer presença de neoformação óssea no interior da lesão, sendo osso maduro ou imaturo (CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007; CARLI; SILVA; PAZA, 2006; GOMES et al., 2007; QUINDERÉ et al., 2008; RESENDE et al., 2007).

O tratamento indicado é a excisão cirúrgica e consequente preservação da área. A recidiva pode ocorrer em decorrência da técnica cirúrgica inadequada, quando o cirurgião-dentista não cureta adequadamente o periósteo subjacente à lesão, ou permanecem pequenas porções da lesão entre os tecidos, que, posteriormente, proliferam e promovem a recidiva da LPCG (FERREIRA, CAVEZZI JÚNIOR, 1994; GOMES et al., 2007; RESENDE et al., 2007).

2.4 Patogenia

A exata patogenia das LCCG e LPCG dos maxilares é ainda controversa, sendo registradas na literatura algumas pesquisas buscando estabelecer parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos confiáveis para predizer o comportamento clínico e o prognóstico das

lesões (FLÓREZ-MORENO et al., 2008; KUMTA et al. 2003; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000). Os alvos de estudo para estabelecer esses parâmetros são as células gigantes multinucleadas (CG) e as células mononucleares (CM) (FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

As CG possuem atividade osteoclástica, já que provocam reabsorção óssea, bem como macrófagica, verificada pela fagocitose de hemossiderina (HAQUE; MOATASIM, 2008). Provavelmente, originam-se da fusão de células mononucleares, que compartilham uma célula-tronco comum com macrófagos, embora o mecanismo preciso ainda não esteja elucidado (HAQUE; MOATASIM, 2008). Tem-se proposto que durante a angiogênese em lesões de células gigantes, monócitos advindos da circulação são recrutados para dentro da lesão através de fatores quimiotáticos, tais como a proteína quimiotática de monócito 1 e o fator transformante de crescimento-beta ($TGF-\beta$, do inglês *transforming growth factor*). Então, células estromais produzem o receptor ativador do fator ligante nuclear κB (RANKL, do inglês *receptor activator of NF-kappaB ligand*) que estimula os monócitos/macrófagos a se transformarem em CG (FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

Embora as CG sejam o achado histológico mais proeminente, o alvo de estudo tem sido as CMs. Estas células mononucleares podem formar células gigantes *in vitro* pela fusão de células que compartilham uma linhagem comum com macrófagos (PAMMER et al., 1998). Assim, não somente as CG, mas também as CM poderiam exercer um papel crucial no curso das lesões de células gigante, devido à sua abundância e à sua ativação, como demonstrado pela superexpressão de CD68 e citocinas proinflamatórias (FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

Para uma melhor elucidação da patogenia da lesão, faz-se necessário tecer alguns comentários sobre a osteoclastogênese.

Os osteoclastos são gerados a partir de células derivadas do tecido hematopoiético sob o controle de diversos fatores locais e sistêmicos. Os mecanismos moleculares que direcionam a atividade de reabsorção dos osteoclastos têm sido investigados. Estão envolvidos na diferenciação osteoclástica o fator de diferenciação osteoclástica, fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$, do inglês *tumor necrosis factor*). O $TGF-\beta$, M-CSF, fator de crescimento hepatócito, interleucina-8, componente C3 do complemento, osteopontina e sialoproteína óssea auxiliam a atividade de reabsorção dos osteoclastos em sítios específicos da matriz (ENGSIG et al., 2000). A destruição osteoclástica do osso mineralizado é mediado através da ação de osteoclastos que atuam sobre a matriz óssea mineralizada e outras enzimas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) (KUMTA et al.,

2003). As MMPs atuam na matriz cartilaginosa não mineralizada do osso, facilitam a migração de osteoclastos em direção à superfície óssea e são indispensáveis para o recrutamento de osteoclastos em desenvolvimento de ossos. A MMP-9 é uma candidata a regular essa função de regulação porque é altamente expressa em osteoclastos (DELAISSÉ et al., 2000; ENGSIG et al., 2000; GEORGES et al., 2009).

As células gigantes semelhantes aos osteoclastos são geralmente observadas como componentes reativos na maioria das lesões ósseas destrutivas. Sua natureza é bem estudada no intuito de melhorar o entendimento a respeito da patogenia das lesões de células gigantes. Análise imuno-histoquímica de células gigantes multinucleadas tanto em LCCG como em LPCG utilizando-se marcadores como α -1-antiquimiotripsina e fator XIIIa, mostrou marcação para essas células, sugerindo que possuem características fenotípicas de histiócitos/macrófagos. Vale salientar também, que estudos histoquímicos evidenciaram que as células multinucleadas possuem a enzima fosfatase ácida tártaro-resistente, que é específica para osteoclastos. Assim, essas células parecem representar um produto da linhagem macrófagos-granulócitos que ainda não foi completamente caracterizada e possuem características tanto de macrófagos quanto de osteoclastos (ITONAGA et al., 2003; TIFFEE; AUFDEMORTE, 1997).

A osteoclastogênese tem sido observada em todas as lesões osteolíticas e envolve a fusão de células CD-68 positivas circulantes que são recrutadas sob a influência de fatores quimioatrativos. De fato, a hipervascularização, a destruição óssea agressiva e a tendência à recorrência local são achados comuns associados com muitas lesões osteolíticas ósseas. O elevado nível de VEGF pode estar relacionado com a extensa destruição osteolítica da lesão e as MMPs podem estar associadas com a progressão local dos tumores. As MMPs estariam atuando na destruição das membranas basais e, juntamente com o VEGF, promovendo a osteoclastogênese, bem como a angiogênese (ENGSIG et al., 2000; KUMTA et al., 2003).

2.5 Matriz extracelular (MEC)

Os tecidos animais e vegetais são constituídos por células e matriz extracelular (MEC), que os apóiam e fornecem suporte. A MEC pode ser escassa, como nos tecidos epiteliais, ou abundante, como ocorre em geral nos tecidos conjuntivos (KATCHBURIAN; ARANA, 1999). A MEC é formada por um conjunto de macromoléculas arranjadas na forma

de uma malha tridimensional formando um arcabouço semelhante a uma rede que envolve as células. Constitui um meio de transporte pelo qual as células recebem os nutrientes do sangue arterial e os produtos a serem excretados são transportados até a circulação eferente. As principais classes de macromoléculas que formam a MEC são as glicosaminoglicanas (hialuronana e sulfatos de condroitina, dermatana, heparana e queratana) e proteoglicanas, além de proteínas estruturais, como o colágeno e elastina e proteínas de adesão, como a fibronectina, laminina e tenascina (EGEBLAD; WERB, 2002; KERR, 2000).

Para facilitar o seu entendimento, a MEC pode se organizar sob duas formas: a matriz intersticial e as membranas basais. A matriz intersticial é formada por tipos fibrilares de colágenos (tipos I, III e IV), não fibrilares, elastina, fibronectina, ácido hialurônico, proteoglicanas e outros componentes. Está presente nos espaços entre epitélio, endotélio, células musculares e no tecido conjuntivo propriamente dito, bem como em tecido ósseo e cartilaginoso. As membranas basais, produzidas por células endoteliais e mesenquimais, são constituídas de forma geral por colágenos dos tipos I, III, IV e VII, laminina, fibronectina, sulfato de heparano e perlecan. Tanto laminina quanto o colágeno IV são constituintes da membrana basal de vasos sanguíneos e sua remodelação ocorre nos processos de neoformação vascular (EGEGLAB; WERB, 2002).

A MEC é secretada localmente e organiza-se em uma rede de espaços que circundam as células, desempenhando muitas funções. Por exemplo, as proteínas da matriz seqüestram moléculas, como a água, para conferir turgor aos tecidos moles, fornecem substrato para aderência, migração e proliferação das células e atuam como reservatório de fatores de crescimento que controlam a proliferação celular, bem como reservatório de proteínas de ligação celular e proteases como as MMPs (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A degradação e a remodelação da MEC são fenômenos que ocorrem durante a morfogênese, na angiogênese, nos processos patológicos e no reparo tecidual. Ocorrem contínuos eventos de síntese e degradação de proteínas colágenas e não colágenas que a compõem pela ação de complexos enzimáticos. Na realidade, vários tipos de proteinases podem participar do *turnover* da MEC; todavia, as MMPs constituem o principal grupo de enzimas que atuam sobre este substrato (EGEGLAB; WERB, 2002).

2.6 Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs)

As primeiras metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) foram identificadas em 1962 em estudo sobre o processo de metamorfose dos girinos no instante da perda da cauda. A partir desse momento, mais de 66 MMPs foram clonadas e seqüenciadas, incluindo 25 MMPs em vertebrados e 22 membros homólogos em humanos. Além destas, é descrita uma série de MMPs em seres não vertebrados e na maior parte dos seres vivos, inclusive procariontes, denotando existir um processo evolutivo de algumas MMPs primordiais ao longo de bilhões de anos (STERNLICHT; WERB, 2001).

As MMPs são um grande grupo de endopeptidases extracelulares zinco e cálcio dependentes (FOLGUERAS et al., 2004; JOBIM et al., 2008). As principais funções das MMPs são a capacidade de degradar, processar, ativar ou inativar os componentes da MEC, assim como facilitar a migração celular através deste meio. Sob condições fisiológicas, as MMPs atuam no desenvolvimento, morfogênese e reparo teciduais; entretanto, se há perda de controle funcional, podem atuar em processos patológicos, como artrites, aterosclerose, doenças autoimunes e periodontais (GJERTSSON et al., 2005; GOLDMAN; SHALEV, 2003; LEWIS; SPEIGHT, 1999; ROY; YANG; MOSES, 2009; STERNLICHT; WERB, 2001; UEDA et al., 1996).

As MMPs consistem em colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18) que clivam o colágeno fibrilar dos tipos I, II e III; gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que degradam o colágeno amorfo, bem como a fibronectina; estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), que atuam sobre uma variedade de componentes da MEC, incluindo proteoglicanos, laminina, fibronectina e colágeno amorfo; a família das metaloproteinases da matriz ligadas à membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-17), que são proteases associadas à superfície celular; e as matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) que também degradam laminina, fibronectina e colágenos não fibrilares (COWAN et al., 2009; GOLDMAN; SHALEV, 2003; ROY; YANG; MOSES, 2009; THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999). Essas enzimas são produzidas por diversos tipos celulares, tais como: fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviais e algumas células epiteliais (JOBIM et al., 2008). Sua secreção é estimulada por fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*) e o fibroblástico (FGF, do inglês *fibroblast growth factor*), citocinas como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor*), fagocitose e estresse físico (ROY; YANG; MOSES, 2009; UEDA et

al., 1996). Entretanto, é inibida por esteróides e pelo fator transformador de crescimento-beta (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Uma grande parte das MMPs está organizada em torno de um domínio catalítico conservado, um pré-peptídeo, um pró-peptídeo e um domínio C-terminal. O domínio catalítico, formado por 170 aminoácidos, possui uma seqüência ligante de zinco e uma metionina altamente conservada, formando uma estrutura ímpar denominada *Met-Turn*. Possui ainda um íon zinco estrutural e dois a três íons cálcio necessários para a estabilidade e expressão enzimática das MMPs. O domínio pré-peptídeo é formado por cerca de 20 aminoácidos e possui o peptídeo sinalizador responsável pelo direcionamento de secreção do composto pela célula. O domínio pró-peptídeo possui cerca de 80 aminoácidos e contém uma cisteína interruptora, a qual se liga ao íon zinco catalítico para manter a latência da enzima (pró-MMP). O domínio hemopexina C-terminal contribui para a especificidade de substrato e interações com inibidores endógenos (KRANE; INADA, 2008; ROY; YANG; MOSES, 2009; STERNLICHT; WERB, 2001).

As MMPs são sintetizadas por vários tipos celulares, incluindo células epiteliais, fibroblastos, células inflamatórias, osteoblastos, osteoclastos e células endoteliais sob diversos estímulos. Em sua maioria, são secretadas na forma de precursores latentes denominados pró-enzimas ou zimogênios, havendo a necessidade de serem clivados no pró-domínio para assumirem a forma ativa. Essa latência se deve a presença de um grupo cisteína-sulfidril não pareado próximo ao domínio pró-peptídeo, o qual age como uma espécie de quarto ligante para o sítio ativo de zinco e a ativação requer quebra desta ligação através da remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo ou por perturbação ectópica da ligação cisteína-zinco (KRANE; INADA, 2008; ROY; YANG; MOSES, 2009). Contudo, há algumas MMPs, tais como MMP-11, MMP-28 e MT-MMP, que possuem um domínio de reconhecimento enzimático *furin-like*, constituído por aminoácidos básicos. Situado entre o domínio catalítico e o pró-peptídeo, este domínio permite que estas MMPs sejam ativadas antes de serem levadas à superfície celular ou serem secretadas (KRANE, INADA, 2008; STERNLICHT; WERB, 2001).

Devido às importantes implicações na biodinâmica da MEC, a expressão das MMPs é firmemente regulada em nível transcricional, pós-transcricional e pela atuação de proteínas ativadoras e inibidoras dentro do meio extracelular (FOLGUERAS et al., 2004), devendo ocorrer no tipo celular adequado, no tempo certo e na quantidade apropriada (MOTT; WERB, 2004; STERNLICHT; WEBER, 2001).

A regulação em nível transcricional ocorre para a maioria das MMPs, exceto para a MMP-2, que após sua expressão constitutiva tem sua atividade controlada através de um exclusivo mecanismo de ativação enzimática e estabilização pós-transcricional do seu RNAm (STERNLICHT; WEBER, 2001). *In vivo*, ésteres de forbol, sinalização por integrinas, hormônios, citocinas e fatores de crescimento e outros indutores estão relacionados à estimulação da expressão dos genes das MMPs. Tais fatores podem ser liberados após inúmeros eventos como estresses físico-químicos, alterações na morfologia celular e durante a autoproteólise celular (MOTT; WEBER, 2004).

Outros agentes, como a indometacina, interleucina-4 (IL-4), retinóides, hormônios da tireóide, glicocorticóides, progesterona e andrógenos, agem como supressores da transcrição gênica das metaloproteinases da matriz (STERNLICHT; WEBER, 2001). Vale ressaltar que a indução ou inibição da expressão dos genes das MMPs também ocorre a partir de interações célula-célula e célula-matriz (GEORGE; DWIVEDI, 2004). Além disso, fenômenos epigenéticos, tais como a acetilação e a metilação do DNA também podem influenciar na regulação transcricional dos genes das MMPs (YAN; BOYD, 2007).

Uma vez formadas, as MMPs ativadas são rapidamente inibidas por uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMP), que são produzidos pela maioria das células mesenquimatosas, impedindo dessa forma, a ação descontrolada dessas proteinases. Além de inativar as MMPs, sabe-se que os TIMPs estão implicados em outras funções biológicas, atuando como agentes mitogênicos para um grande número de células ou, ainda, como inibidores da sinalização da proliferação celular, como por exemplo o TIMP-2. Essa proteína é capaz de inibir a proliferação do endotélio humano induzida pelo fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999).

2.6.1 Metaloproteinase da matriz-9

A MMP-9 (92-kDa, gelatinase B) é uma proteína que pertence ao grupo das enzimas gelatinases, que recebe esta denominação em função de degradar colágeno desnaturado (JOBIM et al., 2008; UEDA et al., 1996). Estruturalmente, a presença de sítios de ligação às gelatinases (três módulos de fibronectina tipo II incorporados), concede a esta enzima aspecto singular entre as formas secretadas de MMPs. Os domínios de ligação às gelatinas determinam alta afinidade de interação com o colágeno extracelular, favorecendo sua

permanência em associação à MEC, que por sua vez, atua como fonte de reserva destas pró-enzimas (FRIDMAN et al., 2003; UEDA et al., 1996).

A MMP-9 tem uma expressão muito bem regulada, não sendo sintetizada constitutivamente, mas induzida por um acionamento adequado. A combinação de linfócitos e monócitos é um potente estímulo para a indução da expressão desta enzima, bem como a IL-1, TNF- α , TGF- β , lectinas, endotoxinas e interação com integrinas. Como citado anteriormente, a MMP-9, assim como as outras MMPs, é expressa principalmente por células inflamatórias (linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos) e em menor escala por células mesenquimais (células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos) (MATTU et al., 2000; XU et al., 2005).

Da mesma forma que as outras MMPs, a MMP-9 é secretada como um zimogênio inativo. Para sua função enzimática ser efetiva, é necessária alteração entre o grupo sulfidril-cisteína, presente no domínio pró-peptídico e o íon Zinco, associado ao domínio catalítico, a qual pode ser desencadeada através de mecanismos mediados por proteínas ou não (FRIDMAN et al., 2003; STERNLICH; WERB, 2001). A MMP-9 pode ser ativada por outras MMPs como a MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-13 e MMP-26. Dentre esse grupo, a MMP-3 é a mais efetiva (FRIDMAN et al., 2003; MOOK; FREDERICKS; VAN NOORDEN, 2004) sendo essa ativação constituída por duas etapas: primeiro, a MMP-3 hidrolisa a cadeia polipeptídica da MMP-9; posteriormente, o segundo sítio de hidrólise encontra-se inacessível, requerendo a presença de alterações na estrutura secundária, ao redor do sítio de ativação, anteriores ao acoplamento ao sítio ativo da MMP-3 (FRIDMAN et al., 2003).

A MT1-MMP inicia a cascata de ativação da MMP-9. Como aquela está associada à membrana celular, ativa-se a pró-MMP-2 e, estas duas enzimas, são capazes de ativar a pró-MMP-13. A totalidade da atividade destas proteases na superfície celular pode acompanhar a degradação eficiente do colágeno intersticial, que é iniciado pela ação colagenolítica da MT1-MMP e MMP-13 e seguida pela atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 (FRIDMAN et al., 2003).

A modificação oxidativa das cadeias laterais dos resíduos de cisteína é uma forma de ativação da MMP-9 não-proteolítica. Essa alteração resulta em diminuição da sua habilidade em estabelecer ligações efetivas ao íon catalítico zinco, bem como alterações conformacionais induzidas por ligações ao substrato (gelatina e colágeno IV) (BANNIKOV et al., 2002; BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005). Assim, isso pode resultar na atividade enzimática sem clivagem do domínio inibitório pró-peptídeo.

Um outro fator indutor que aumenta a expressão de MMP-9 que pode ser salientado é o VEGF. Ocorre um *feedback* positivo entre a MMP-9 e o VEGF em condições de hipóxia (HOLBORN et al., 2007), além da clivagem das proteínas extracelulares pela MMP-9 liberar o VEGF ligado ao fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF, do inglês *connective tissue growth factor*) (JOBIM et al., 2008; RUNDHAUG, 2005).

A relação da MMP-9 com a angiogênese é muito importante. A MMP-9 regula tanto positivo quanto negativamente a neovascularização. O principal componente da membrana basal vascular, o colágeno tipo IV é clivado pela MMP-9. Após esse evento, fica exposto um sítio crítico presente no colágeno tipo IV desnaturado, que é somente evidenciado em vasos sanguíneos em proliferação, mas não nos quiescentes. A ligação deste epítipo específico exposto à integrina $\alpha_v\beta_3$ é importante para que ocorra a angiogênese e a MMP-9 é eficiente em expor esses sítios. A inibição desse epítipo por anticorpos ou a deficiência de MMP-9 reduz a angiogênese (CORNELIUS et al., 1998; KUMTA et al., 2003).

Todavia, a MMP-9 regula negativamente a angiogênese, pois ao degradar a MEC, há liberação de fragmentos proteolíticos com atividade anti-angiogênica como a angiostatina, endostatina e tumstatina (CORNELIUS et al., 1998).

A MMP-9 tem sido identificada em células gigantes multinucleadas de tumores de células gigantes (TCG) (KUMTA et al., 2003; UEDA et al., 1996). Apesar de ser considerado um neoplasma benigno de ossos longos, o TCG tende a ser agressivo e recorrente e especula-se se alguns casos de LCCG agressivas e recorrentes dos maxilares seriam variantes do TCG de ossos longos. A MMP-9 facilita a migração de osteoclastos para superfície óssea, como também cliva e ativa a IL-1 – um potente estimulador de reabsorção óssea –; adicionalmente, tem sido associada com a progressão local de tumores, pois atua na degradação da membrana basal dos vasos, atuando sinergicamente com o VEGF. Dessa forma, a MMP-9 estaria envolvida com a osteoclastogênese e angiogênese (KRANE; INADA, 2008; KUMTA et al., 2003). Em um estudo recente, foi observada a imunexpressão e análise de RNAm da mesma em casos de TCG. Foi observado que TCG em estágios mais avançados e, principalmente, nos recorrentes havia uma grande quantidade de células gigantes positivas à imunomarcagem da MMP-9 e, proporcionalmente, a expressão do gene da MMP-9, através da mensuração semi-quantitativa do RNAm da MMP-9, estava maior em estágios avançados e recorrentes do TCG (KUMTA et al., 2003). Diante do exposto, verifica-se que a expressão e a atividade da MMP-9 é aumentada nesse tipo de tumor e está correlacionada com o avanço do estágio e invasão, o que sugere que a MMP-9 desempenha um papel contribuidor na progressão do tumor. Georges et al. (2009) salientam que as MMPs promovem a progressão tumoral não

somente pela degradação da MEC, mas também pela regulação da angiogênese e imunidade inata.

2.7 Angiogênese

O termo angiogênese é uma palavra de origem grega (aggeion: vaso, gênese: formação) utilizada para designar a produção de novos capilares a partir de vasos pré-existentes. Está envolvida em importantes processos fisiológicos que demandam maior aporte sanguíneo como a embriogênese e alterações associadas ao ciclo reprodutivo feminino. Em eventos patológicos, como as reações inflamatórias, condições isquêmicas, crescimento tumoral e metástase, é iniciada em resposta à hipóxia, a partir da secreção de fatores angiogênicos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Algumas etapas são necessárias para o desenvolvimento de um novo vaso capilar durante a angiogênese. A biodinâmica da neovascularização pode ser dividida em fase de ativação (brotamento) e fase de resolução. A fase de ativação é caracterizada pelos seguintes eventos: após o episódio de hipóxia, há a liberação de fatores angiogênicos; logo após, há um aumento da permeabilidade vascular e deposição de fibrina extravascular; em seguida, ocorre a degradação proteolítica da membrana basal vascular, permitindo a formação de um broto capilar, com migração das células endoteliais em direção à fonte de estímulo quimiotático; concomitantemente, há a degradação da matriz extracelular em torno do vaso para permitir a invasão das células endoteliais e formação do lúmen capilar. Encerrada a fase de ativação, prossegue-se a fase de resolução da angiogênese: ocorre a inibição da proliferação das células endoteliais, cessando a migração celular; sucede-se a reconstituição da membrana basal vascular e a remodelagem dos tubos capilares; e, posteriormente, recrutamento de células perioendoteliais para sustentar os tubos endoteliais, tornando possível a manutenção e função de células acessórias para o vaso (PEPPER, 1997; RUIZ, 2008; RUNDHAUG, 2005).

Convém destacar algumas proteínas que participam da biodinâmica da angiogênese e suas funções no processo. Na fase de ativação pode-se salientar o fibrinogênio, as MMPs, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês *basic fibroblast growth factor*), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*), o fator estimulador de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte colony-*

stimulating factor), o fator de crescimento placentário (PGF, do inglês *placenta growth factor*), o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*), a angiogenina, a proliferina, o TGF- α , o TGF- β , o TNF- α e a IL-8. Esses fatores são produzidos por macrófagos ativados, mastócitos e linfócitos, sendo esses dois últimos responsáveis também pela liberação de citocinas e fatores quimiotáticos para as células endoteliais (CARLILE et al., 2001; JOBIM et al., 2008; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O fibrinogênio é extravasado logo após o aumento da permeabilidade vascular. É uma proteína de coagulação sanguínea, que é polimerizado e forma um denso gel de fibrina permeando o vaso. A rede de fibrina formada servirá como arcabouço temporário para a proliferação das células endoteliais. Todavia, também representa uma barreira para migração das células endoteliais e deverá ser eliminada posteriormente para movimentação celular. Essa digestão enzimática é realizada pelas MMPs (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; RUNDHAUG, 2005)

As MMPs, juntamente com a plasmina, desorganizam e degradam seletivamente a membrana basal vascular, permitindo a proliferação das células endoteliais e a formação dos brotos vasculares. É muito importante a interação das células endoteliais com os componentes da matriz extracelular circunjacente, pois somente as proteases apropriadas para a dissolução do substrato específico serão liberadas. Dessa forma, apenas fibrina suficiente para a invasão endotelial é degradada, enquanto que parte da matriz provisória é mantida para alojar a nova rede capilar e as populações acessórias. Um desequilíbrio nessa relação – células endoteliais e matriz extracelular – pode provocar a atividade proteolítica em excesso que resultará na formação de estruturas vasculares aberrantes ou a ausência de proteólise, culminando na inibição da invasão e formação do lúmen do vaso (PEPPER, 1997; RUIZ, 2008; RUNDHAUG, 2005).

Prosseguindo a proteólise da rede de fibrina, a atividade mitogênica das células endoteliais é estimulada pelo VEGF e FGFb que se ligam a seus receptores, induzindo a formação de brotos vasculares, representados por pseudópodes endoteliais simples que tendem a formar uma rede capilar. Em conjunto à proliferação das células endoteliais, células adjacentes secretam fatores de crescimento como TGF- α , TGF- β e PDGF que através de um efeito parácrino estimulam outras células – pericitos e fibroblastos, por exemplo – à síntese e secreção de fatores angiogênicos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; RUIZ, 2008; RUNDHAUG, 2005).

Na fase de resolução da neoformação vascular, o balanço entre as proteases e seus inibidores merece consideração. A proteólise não cessa neste momento, mas permanece de

forma tênue, estando implicada com a regulação da atividade de citocinas e com a ativação de formas latentes de TGF- β . Efetua-se ainda a geração de fragmentos proteolíticos com atividade regulatória para a angiogênese, como a angiostatina, endostatina, trombospondina e angiopoetina que inibem a proliferação das células endoteliais. Este último inibidor interage com os receptores Tie-2, recrutando células periendothelias que atuam na estabilização dos vasos recém-formados. O PDGF e o TGF- β ligam-se a seus receptores (PDGF-R e TGF- β R, respectivamente) e, juntamente com a angiopoetina, promovem a maturação e remodelação vascular (FERRARA, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; NIIDA et al., 1999; SEGHEZZI et al., 1998; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007).

A metodologia para a mensuração da vascularização é bastante variável. Dentre as técnicas mais empregadas para esta quantificação, destaca-se a densidade microvascular (MVD) que expressa a média de vasos por espécime. A partir da escolha da área com maior quantidade de vasos em um aumento de 100x, procede-se à contagem manual em microscopia de luz em um aumento de 200x em 3 campos. Tem-se então a MVD alta, expressa em mm², ou ainda, em 10-15 campos sendo a MVD média cujo resultado é expresso em média por desvio padrão (WEIDNER et al., 1991).

Ainda há a técnica do volume microvascular (MVV), que consiste em um método esterológico de determinação de volume, no qual são selecionados 15 campos e contados 100 pontos coincidentes em cada, em um total de 1500 pontos, sendo o resultado expresso em % de volume (PAZOUKI et al., 1997).

Outra técnica empregada para análise quantitativa dos vasos é a da contagem microvascular (MVC), que se constitui de um método simples, no qual, através de um aumento de 40x, verificam-se áreas de maior densidade vascular e, posteriormente, com um aumento de 200x, contam-se manualmente os vasos, sendo o resultado expresso pelo número médio de vasos em cada secção histológica (MAEDA et al., 1995).

O anticorpo utilizado pode interferir na mensuração da vascularização pela microscopia de luz empregando a técnica da imuno-histoquímica. É prudente certa cautela na eleição do anticorpo, pois determinados antígenos são compartilhados por diversos tipos celulares e podem reagir ao mesmo anticorpo. Os anticorpos que apresentam melhor afinidade por epítomos específicos das células endoteliais e proporcionam melhores resultados na quantificação da angiogênese são o anti-CD31 e o anti-fator de Von Willebrand (anti-FvW) (RUIZ, 2008; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007).

O fator de Von Willebrand é uma glicoproteína multimétrica, circulante no plasma sanguíneo, sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos. Desempenha um papel

importante na hemostasia primária, formando pontes entre glicoproteínas plaquetárias e estruturas do endotélio vascular, além de manter os níveis plasmáticos do fator VIII, protegendo esta proteína pró-coagulante da degradação proteolítica (ZUCKER et al., 1998).

2.7.1 Fator de crescimento vascular endotelial

A angiogênese é um fenômeno modulado por diversas citocinas e fatores de crescimento como fator de crescimento vascular endotelial e fator de crescimento fibroblástico (FERRARA, 2004; NIIDA et al., 1999; SEGHEZZI et al., 1998; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007). O VEGF compreende uma família de proteínas multifuncionais envolvidas na formação de vasos em situações normais e patológicas. A família do VEGF inclui o VEGF-A ou VEGF, -B, -C, -D, -E e fatores de crescimento placentário. Há quatro principais isoformas de VEGF: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆. O VEGF₁₆₅ é a isoforma mais frequente e a mais mitogênica (MITROU et al., 2009).

O VEGF tem um papel muito importante na vasculogênese e angiogênese, pois é um potente e seletivo fator mitogênico para o endotélio (CARLILE et al., 2001; JOBIM et al., 2008). Ele produz uma rápida resposta angiogênica e um aumento da permeabilidade capilar. Esse fator é secretado por muitas células mesenquimais e do estroma, e as células do endotélio vascular possuem receptores específicos para ele. O VEGF liga-se a um de seus receptores (VEGF-R2) sobre os angioblastos, induzindo a formação e proliferação de células endoteliais (MITROU et al., 2009). Posteriormente, a ligação com um segundo receptor distinto (VEGF-R1) induz a formação de tubos, que é característica dos capilares. A maturação e a elaboração de estruturas mais elaboradas fica sob responsabilidade das angiopoetinas que interagem com o receptor Tie-2 das células endoteliais (FERRARA, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; NIIDA et al., 1999; SEGHEZZI et al., 1998).

A expressão do VEGF é estimulada por certas citocinas e fatores de crescimento, como por exemplo, TGF- α , TGF- β , PDGF, FGF, IL-1 e IL-8, endotoxinas, estrógeno, além da hipóxia tecidual (FERRARA, 2004; RUNDHAUG, 2005; SEGHEZZI et al., 1998).

As LCCGs contêm duas características principais: são osteolíticas e abrigam um considerável número de células mononucleadas e células gigantes imunorreativas para fatores angiogênicos (VERED et al., 2007), fazendo-se necessário ainda se pesquisar se as funções

osteoclásticas são dependentes de células endoteliais e/ou de seus fatores associados. Como as células precursoras dos osteoclastos provêm da medula óssea e essas se encontram na circulação sanguínea, a angiogênese estimulada facilitaria a distribuição de precursores hematopoiéticos e imunes na área da lesão. Isso, então, resultaria em um grande número de precursores osteoclásticos que agora poderiam emigrar da circulação periférica e desenvolverem-se em células de reabsorção caracterizando a osteoclastogênese (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). Em tumores de células gigantes, a alta expressão de VEGF é associada a graus avançados dessa lesão, já que as lesões recorrentes mostraram altas médias de expressão de VEGF (KUMTA et al., 2003).

Uma outra vertente que tem sido muito investigada é o papel do VEGF no recrutamento de osteoclastos (ENGSIG et al., 2000). Os efeitos do VEGF freqüentemente têm sido interpretados no contexto de quimiotaxia em células endoteliais. Entretanto, osteoclastos e monócitos expressam VEGF-R1 e o VEGF pode auxiliar no aumento numérico dessas células. Além disso, os monócitos, após esse estímulo, podem produzir VEGF e amplificar a angiogênese (FERRARA, 2004). Um estudo mostrou que o VEGF age diretamente em osteoclastos e promove sua atividade invasiva em cultura de ossos metatarsais. Foi observado que células endoteliais e osteoclastos foram responsivas ao VEGF, sendo a invasão da diáfise do osso primitivo metatarsal aproximadamente simultânea para ambos os tipos celulares. A MMP-9 é capaz de liberar VEGF ligado à MEC pela clivagem das proteínas extracelulares, além de coordenar a degradação de matriz extracelular. Dessa forma, a MMP-9 atuaria indiretamente no recrutamento de células endoteliais e osteoclastos através da maior liberação de VEGF ao meio intersticial. Isso sugere uma ação integrada da MMP-9 e VEGF no desenvolvimento dos ossos (ENGSID et al., 2000).

Um estudo de tumores ósseos primários, malignos e benignos, tem demonstrado que muitas células formadoras de ossos e muitas que atuam na reabsorção, assim como as células endoteliais vasculares são positivas ao VEGF. Por exemplo, em osteoblastoma, tanto os osteoblastos quanto as células gigantes semelhantes aos osteoclastos foram imunorreativas ao VEGF. Nos 15 sarcomas osteogênicos, o VEGF foi observado em todas as lesões em ambos tipos celulares (células mononucleadas e multinucleadas) (SULZBACHER et al., 2002).

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo da pesquisa é observar através da análise imuno-histoquímica a expressão de MMP-9 e VEGF em células gigantes multinucleadas e células mononucleadas e mensurar a vascularização através da expressão do FvW em uma série de casos de lesões centrais e periféricas de células gigantes, analisando possíveis associações e correlações entre a expressão destes marcadores e essas lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

A presente pesquisa consiste em uma análise quantitativa da expressão imunohistoquímica da MMP-9, do VEGF e do FvW em espécimes teciduais de lesões centrais de células gigantes e lesões periféricas de células gigantes.

4.2 População

O universo deste estudo foi representado por todos os casos registrados no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN.

4.3 Amostra

A amostra foi intencional e dentre os casos diagnosticados no serviço supracitado, foram selecionados 20 espécimes de lesões centrais de células gigantes e 20 espécimes de lesões periféricas de células gigantes. Foram coletados dados referentes às informações clínicas dos pacientes (gênero, raça, idade e localização anatômica) e anotadas em fichas (APÊNCIDE A e B).

4.3.1 Caracterização da amostra

As frequências relativas ao gênero, raça e sítio anatômico das lesões centrais e periféricas de células gigantes encontram-se listadas no quadro 1.

| Variáveis | Lesão | |
|--------------------------|-------------|-------------|
| | LCCG n(%) | LPCG n(%) |
| Gênero | | |
| Feminino | 12 (60,0%) | 8 (40,0%) |
| Masculino | 8 (40,0%) | 12 (60,0%) |
| Total n(%) | 20 (100,0%) | 20 (100,0%) |
| Raça* | | |
| Leucoderma | 10 (55,6%) | 5 (45,5%) |
| Feoderma | 4 (22,2%) | 6 (54,5%) |
| Melanoderma | 4 (22,2%) | 0 (0,0%) |
| Total n(%) | 18 (100,0%) | 11 (100,0%) |
| Sítio anatômico** | | |
| Maxila | 10 (50,0%) | 12 (63,2%) |
| Mandíbula | 10 (50,0%) | 7 (36,8%) |
| Total n(%) | 20 (100,0%) | 19 (100,0%) |

QUADRO 1: Frequências referentes ao gênero, raça e sítio anatômico dos casos de lesão central e periférica de células gigantes. Legenda: LCCG – lesão central de células gigantes; LPCG – lesão periférica de células gigantes; * - 11 não referenciados; ** - 1 não referenciado.

4.4 Critérios de seleção da amostra

4.4.1 Critérios de inclusão

- Amostras teciduais oriundas de pacientes que não tenham recebido tratamento prévio com algum medicamento.
- Quantidade suficiente de tecido da lesão no material arquivado referente a cada caso.

4.4.2 Critérios de exclusão

- Teve-se o cuidado para não selecionar blocos de parafina contendo material descalcificado, a fim de não comprometer a qualidade das reações de coloração pela técnica da imuno-histoquímica.
- Casos que não atenderam aos critérios de inclusão.

4.5 Estudo imuno-histoquímico

4.5.1 Coloração pelo método imuno-histoquímico

Todos os espécimes selecionados, fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos com 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e submetidos à técnica da imunoperoxidase pelo método da estreptoavidina-biotina (LSAB, do inglês *Labeled Streptavidin Biotin*) utilizando os anticorpos monoclonais anti-MMP-9, anti-VEGF e anti-FvW.

Como controle positivo para o anticorpo anti-MMP-9 foram utilizados cortes histológicos de intestino grosso humano inflamado e para o anticorpo anti-VEGF e anti-FvW cortes histológicos de rim humano. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino a 1% (*BSA – Bovine Serum Albumin*) em solução tampão. A técnica que foi utilizada seguiu o seguinte protocolo:

- 1) Desparafinização: 2 banhos em xilol, ambos por 10 minutos à temperatura ambiente (TA);
- 2) Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - álcool etílico absoluto I (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto II (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto III (5 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto IV (5 minutos) TA;
 - álcool etílico 95°GL (5 minutos) TA;
 - álcool etílico 80°GL (5 minutos) TA;
- 3) Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95° por 10 minutos, à temperatura ambiente;
- 4) Lavagem em água corrente por 10 minutos;

- 5) Duas passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 6) Recuperação dos sítios antigênicos (QUADRO 2);
- 7) Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 8) Duas incubações dos cortes, pelo período de 10 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes, em uma proporção de 1/1 para bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- 9) Lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 10) Duas passagens em solução tampão TRIS-HCl [0,0499 mol/l] (tris-hidroximetilaminometano, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) com NaCl [0,1454 mol/l] pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 11) Incubação dos cortes com os anticorpos primários (QUADRO 2) diluídos em solução diluente Dako (*Antibody diluent with background reducing components*; Dako, A/S, Glostrup, Dinamarca);
- 12) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 13) Incubação com o anticorpo secundário (*Biotinylated link universal*, DAKO, A/S, Glostrup, Dinamarca + System-HRP, diluição 1:200) durante 30 minutos - TA;
- 14) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 15) Incubação com o complexo estreptoavidina-biotina HRP (DAKO, A/S, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos, à temperatura ambiente;
- 16) Imersão em TRIS-HCl pH 7,4, duas trocas de 5 minutos cada;
- 17) Aplicação do agente cromógeno diaminobenzidina 25 a 30 mg (3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), diluída em 100 ml TRIS-HCl pH 7,4, acrescida de 1,2 ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes durante 3 minutos na câmara escura;
- 18) Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 19) Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- 20) Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 10 minutos à temperatura ambiente;
- 21) Lavagem em água corrente – 10 minutos;
- 22) Duas passagens em água destilada por 5 minutos cada;
- 23) Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - álcool etílico 80°GL (2 minutos) TA;
 - álcool etílico 95°GL (2 minutos) TA;
 - álcool etílico absoluto I (5 minutos) TA;

- álcool etílico absoluto II (5 minutos) TA;
- álcool etílico absoluto III (5 minutos) TA;
- 24) Diafanização em dois banhos de xilol: xilol 1 (2 minutos) e xilol 2 (2 minutos);
- 25) Montagem da lamínula em resina Permout[®] (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

| Especificidade | Clone | Diluição | Fabricante | Recuperação antigênica | Tempo de incubação |
|-----------------------|--------------|-----------------|--------------------------|--|---------------------------|
| MMP-9 | 2C3 | 1:80 | Novocastra Laboratories | Citrato pH 6,0, Pascal | Overnight (18 horas) |
| VEGF | C-1 | 1:600 | Santa Cruz Biotechnology | Tripsina 0,1% pH 7,9, 37°C, 60 minutos | Overnight (18 horas) |
| FvW | F8-86 | 1:50 | Dako Cytomation | Citrato pH 6,0, Pascal | 60 minutos |

QUADRO 2: Especificidade do anticorpo, clone, diluição, fabricante, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo imuno-histoquímico.

4.5.2 Análise imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF

A análise foi feita por um examinador e realizada duas vezes. O procedimento de quantificação seguiu um método adaptado proposto por Florez-Moreno et al. (2008). Em um aumento de 100x elegeu-se a área com maior quantidade de células gigantes em cada lâmina, independentemente da marcação imuno-histoquímica. Posteriormente, oito campos histológicos selecionados aleatoriamente em cada caso foram fotografados em um aumento de 400x utilizando-se microscópio de luz OLYMPUS[®] com máquina fotográfica digital OLYMPUS[®] acoplada. Estas imagens foram transferidas para o computador através do sistema OLYMPUS *Master* v.1.41 EX, e as células contadas com o auxílio do *software* IMAGE J[®]. Primeiramente, em cada campo, contaram-se as células gigantes positivas (células com o citoplasma acastanhado, independente da intensidade de coloração) e depois as células gigantes negativas (o *software* permitiu contagem simultânea na mesma imagem). Anotou-se em uma ficha apropriada o número de células gigantes positivas e o número total de células gigantes (positivas + negativas). Após a contagem nos 8 campos, somou-se os números referentes às células gigantes positivas (P) e depois os referentes aos totais de células gigantes (T). Em seguida, dividiu-se P por T e multiplicou-se por 100 para obter o percentual

de células gigantes positivas para o caso. De posse desse percentual, atribuiu-se um escore para cada caso, sendo: escore 0 (nenhuma célula gigante positiva), 1 (entre maior que 0 a menor ou igual a 25% das células positivas), 2 (entre maior que 25% a menor ou igual a 50% das células positivas), 3 (entre maior que 50% a menor ou igual a 75% das células positivas) e 4 (maior que 75% das células positivas) (APÊNDICE C). Esse procedimento foi realizado para os dois marcadores (MMP-9 e VEGF) em ambas as lesões.

Para a contagem das células mononucleadas, realizou-se o mesmo procedimento nos mesmos campos obtidos para as células gigantes. Assim como nas células gigantes, as células mononucleadas foram avaliadas pela expressão de MMP-9 e VEGF em ambas as lesões.

Em um segundo momento, de posse desses valores, somou-se o P das células gigantes com o das células mononucleadas da expressão da MMP-9 na LCCG, bem como o T, e dividiu-se P_{final} por T_{final} , posteriormente, multiplicando por 100. Assim, obteve-se o percentual em cada caso para a expressão global da MMP-9 para a LCCG, aplicando em seguida a faixa de escores. Esse procedimento foi realizado para a expressão da MMP-9 na LPCG, assim como do VEGF na LCCG e LPCG.

4.5.3 Análise imuno-histoquímica do FvW

Para análise quantitativa dos vasos, foi realizada a contagem microvascular (MVC), proposta por Maeda et al. (1995). Em cada espécime, sob microscopia de luz e com aumento de 40x, foram identificadas 5 áreas que apresentavam maior imunorreatividade. Nestes campos, sob aumento de 200x, foram quantificados os vasos imunorreativos ao anticorpo anti-FvW e, posteriormente, realizou-se uma média aritmética da quantidade de vasos marcados nos cinco campos. Vasos sanguíneos, com ou sem lúmen distinto, e células endoteliais isoladas imunorreativas foram considerados no processo de contagem. Os dados obtidos foram anotados em fichas (APÊNDICE D).

4.6 Análise estatística

Foram aventados quatro pares de hipóteses para o presente estudo:

H₁

H_{1.0}: Não há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM intralesionais.

H_{1.1}: Há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM intralesionais.

H₂

H_{2.0}: Não há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM entre as lesões centrais e periféricas de células gigantes.

H_{2.1}: Há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM entre as lesões centrais e periféricas de células gigantes.

H₃

H_{3.0}: Não há diferenças na expressão global imuno-histoquímica de cada proteína analisada (MMP-9, VEGF e FvW) entre lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

H_{3.1}: Há diferenças na expressão global imuno-histoquímica de cada proteína analisada (MMP-9, VEGF e FvW) entre lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

H₄

H_{4.0}: Não há correlação na expressão global imuno-histoquímica da MMP-9, VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

H_{4.1}: Há correlação na expressão global imuno-histoquímica da MMP-9, VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

Com o intuito de testar as hipóteses supracitadas, os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos apropriados. Os dados foram digitados em planilhas

eletrônicas Excel (*Microsoft Office 2007 for Windows*) e, posteriormente, transferidos para o programa SPSS (*Statistical for Social Science version 17.0 for Windows*) para análise estatística.

Para os três primeiros pares de hipóteses (H_1 , H_2 e H_3), em virtude da ausência de distribuição normal, a avaliação dos escores da MMP-9 e do VEGF nas CG e CM, bem como o FvW nas LCCG e LPCG, foi realizada através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

O quarto par de hipóteses (H_4) foi avaliado utilizando-se o teste de correlação de Spearman.

Para todos os testes estatísticos utilizados, foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

4.7 Implicações éticas

O presente estudo foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (088/09) e pelo Sistema Nacional de Ética na Pesquisa-SISNEP que teve o parecer APROVADO (ANEXO A).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados imuno-histoquímicos

5.1.1 Lesão central de células gigantes

A expressão imuno-histoquímica da MMP-9 localizou-se no citoplasma das células gigantes multinucleadas (CG) e células mononucleadas (CM), bem como em algumas células endoteliais (FIGURA 1). Em 100% dos casos houve imunomarcação da referida proteína para ambos os tipos celulares (TABELA 1).

Para as células gigantes, detectou-se em 100% dos casos o escore 4 (TABELA 1). A quantidade de células imunorreativas variou de 18 a 172, tendo uma média geral de 97,9 (APÊNDICE E). Por sua vez, para o componente mononuclear os escores variaram do 1 (10% dos casos) ao 4 (75% dos casos) (TABELA 1). O número de células imunomarcadas variou de 93 a 6267, com uma média de 2885 células (APÊNDICE E).

Em relação ao VEGF, observou-se imunomarcação em citoplasma das células gigantes multinucleadas e células mononucleadas (FIGURA 2), e por vezes, em células endoteliais (FIGURA 3). Dos 20 casos, evidenciou-se imunorreação em 19 (95%) para as CG e CM (TABELA 1).

Nas CG, o escore 4 teve uma freqüência em 55% dos casos (TABELA 1). O número de células gigantes positivas ao referido anticorpo variou de 0 a 209, emergindo uma média de 63,8 (APÊNDICE E). Para as CM os dados revelam que 55% dos casos tiveram o escore 4 (TABELA 1), tendo de 0 a 7012 células exibindo imunopositividade, com uma média de 2982,5 (APÊNDICE E).

Foi verificada imunoexpressão do FvW em células endoteliais de vasos sanguíneos com lúmen conspícuo, bem como em brotamentos capilares de lúmens pouco distintos e células isoladas (FIGURA 4). Notou-se em 100% dos casos de LCCG imunorreação ao FvW (TABELA 2), tendo-se uma média da MVC em 9,48, variando de 1 a 44,89.

TABELA 1 – Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-MMP-9 e -VEGF quanto ao tipo celular em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Caso | MMP-9 | | VEGF | |
|------|-------|----|------|----|
| | CG | CM | CG | CM |
| 1 | 4 | 1 | 3 | 4 |
| 2 | 4 | 2 | 4 | 3 |
| 3 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| 4 | 4 | 1 | 4 | 3 |
| 5 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| 6 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 7 | 4 | 4 | 1 | 4 |
| 8 | 4 | 3 | 4 | 4 |
| 9 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| 10 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 11 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 12 | 4 | 4 | 3 | 4 |
| 13 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 14 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| 15 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| 16 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 17 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 18 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| 19 | 4 | 4 | 2 | 4 |
| 20 | 4 | 4 | 3 | 4 |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: CG – célula gigante multinucleada; CM – célula mononucleada.

TABELA 2 – Distribuição da MVC para o anticorpo anti-FvW em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Caso | MVC |
|-------------|------------|
| 1 | 4,2 |
| 2 | 11,2 |
| 3 | 8,4 |
| 4 | 4,4 |
| 5 | 44,8 |
| 6 | 3,2 |
| 7 | 5,2 |
| 8 | 11,6 |
| 9 | 15,8 |
| 10 | 24,6 |
| 11 | 7,6 |
| 12 | 5 |
| 13 | 2,4 |
| 14 | 5,2 |
| 15 | 6,8 |
| 16 | 5,6 |
| 17 | 5,8 |
| 18 | 12,6 |
| 19 | 4,2 |
| 20 | 1 |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: MVC – contagem microvascular.

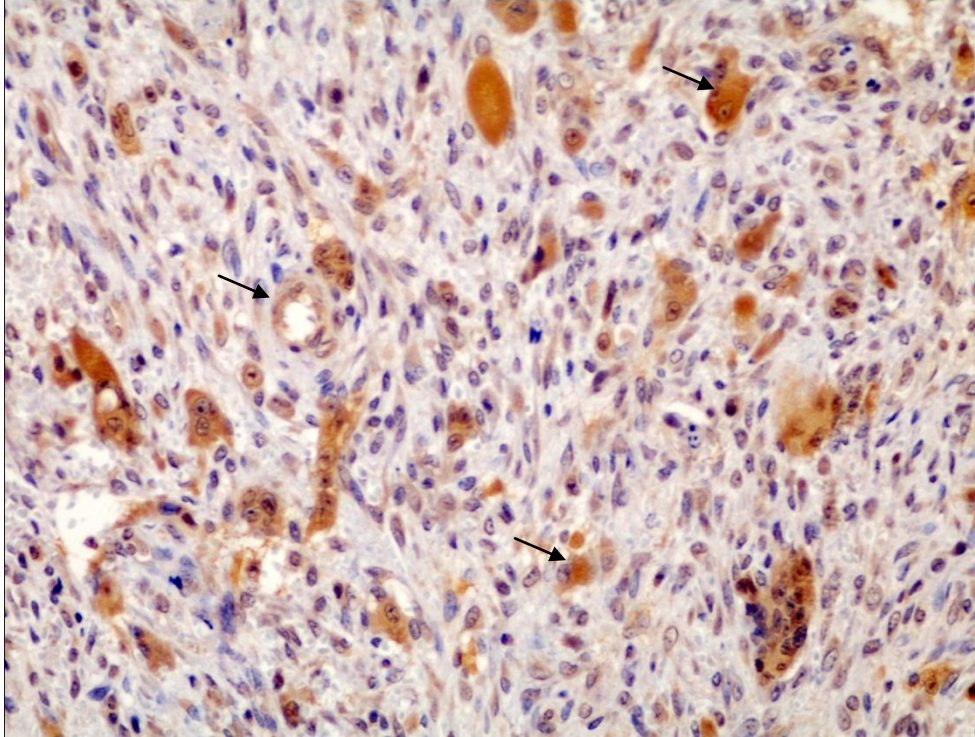


FIGURA 1 – Expressão imuno-histoquímica da MMP-9 em lesão central de células gigantes evidenciada em citoplasma de células multinucleadas e células mononucleadas e em células endoteliais. LSAB (400X).

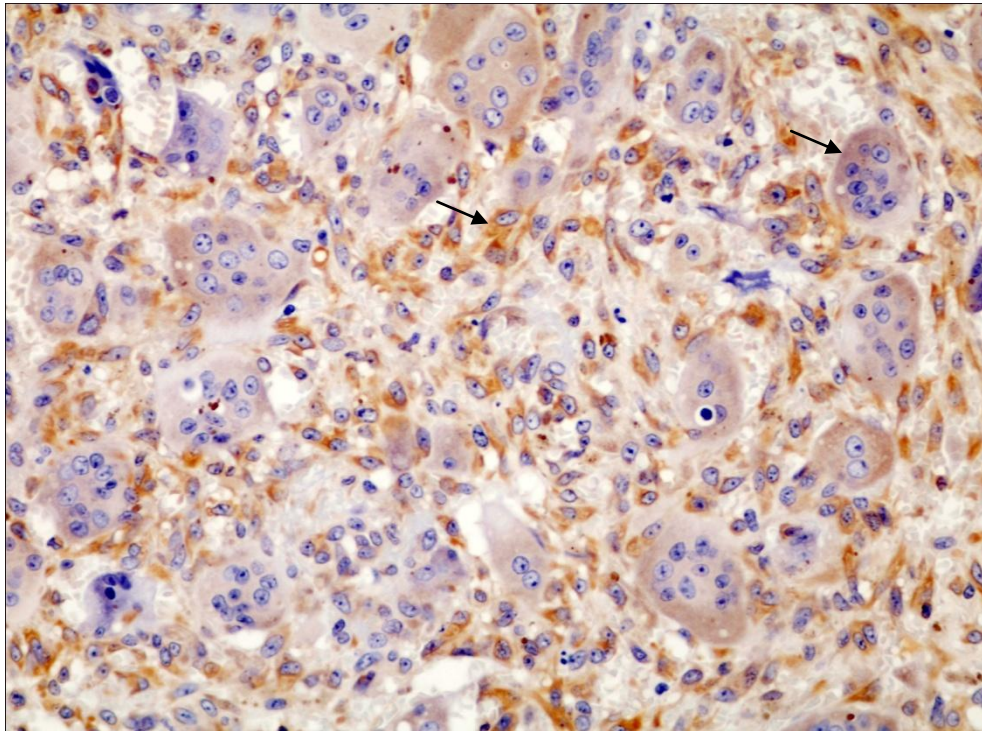


FIGURA 2 – Expressão imuno-histoquímica do VEGF em lesão central de células gigantes evidenciada em citoplasma de células multinucleadas e células mononucleadas. LSAB (400X).

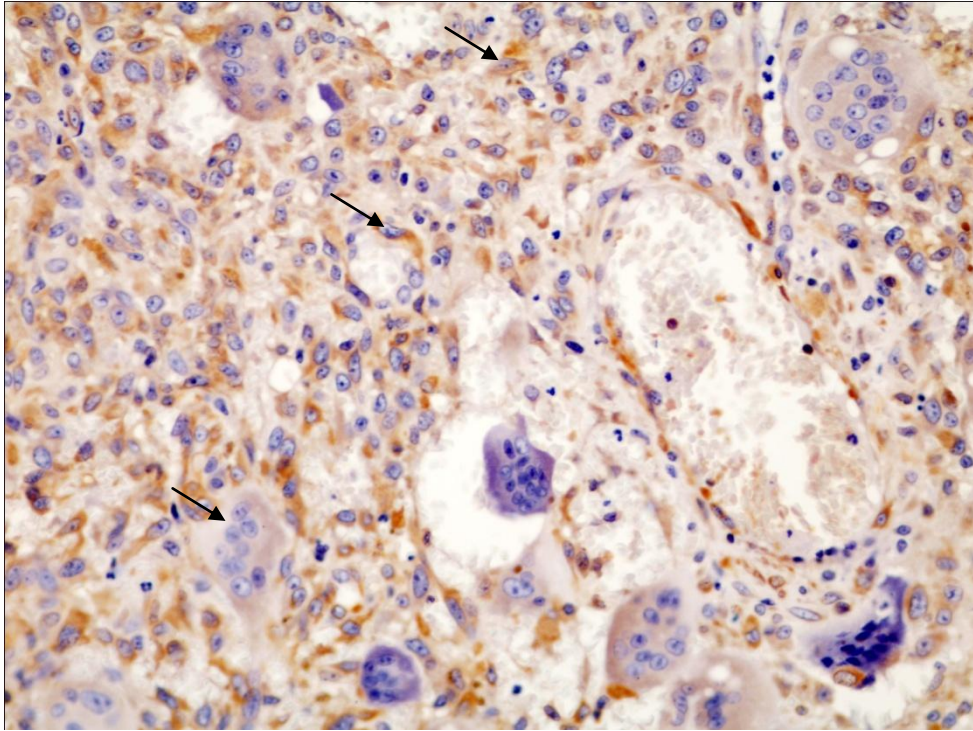


FIGURA 3 – Expressão imuno-histoquímica do VEGF em lesão central de células gigantes evidenciada em citoplasma de células multinucleadas, células mononucleadas e células endoteliais. LSAB (400X).

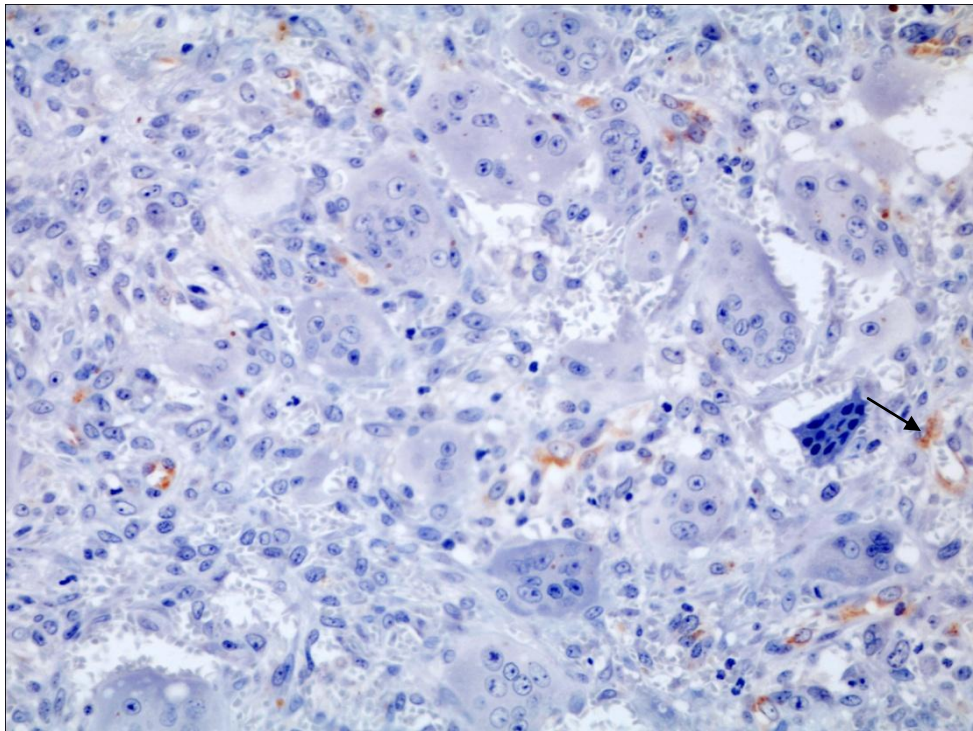


FIGURA 4 – Expressão imuno-histoquímica do FvW em lesão central de células gigantes, marcando células endoteliais. LSAB (400X).

5.1.2 Lesão periférica de células gigantes

A imunomarcção para a MMP-9 foi observada em localização citoplasmática das células gigantes multinucleadas e mononucleadas (FIGURA 5), assim como em algumas células endoteliais (FIGURA 6). Em 100% dos casos houve imunorreção da referida proteína para ambos os tipos celulares (TABELA 3).

Nas CG, evidenciou-se para o escore 4 uma freqüência de 65% dos casos, enquanto o escore 1 apenas 15% (TABELA 3). A quantidade de células gigantes imunomarcadas variou de 2 a 190, com uma média geral de 88,15 (APÊNDICE F). O componente mononuclear revelou um percentual em 60% dos casos de escore 4, e 10% para escore 1 (TABELA 3). Ao analisar o número de células imunopositivas, verifica-se que teve um valor mínimo de 664 e o máximo de 5812, tendo uma média de 2624,5 células (APÊNDICE F).

Com relação ao VEGF, observou-se imunomarcção em citoplasma das células gigantes multinucleadas e mononucleadas e, ocasionalmente, em células endoteliais (FIGURA 7). Evidenciou-se imunorreção em 17 (85%) casos nas CG e em 18 (90%) dos 20 casos nas CM (TABELA 3).

No tipo celular gigante multinucleado, verificou-se em 55% dos casos a ocorrência do escore 4 e em 10% o escore 2 (TABELA 3), com 0 a 151 células marcadas, resultando em uma média geral de 70,35 (APÊNDICE F). O componente mononuclear, por sua vez, exibiu um percentual de 25% dos escores 2 e 4 e 20% para os escores 1 e 3 (TABELA 3). Houve uma variação de 0 a 7138 no número de células positivas, com uma média de 2358,3 (APÊNDICE F).

Verificou-se imunoexpressão do FvW em células endoteliais de vasos sangüíneos com lúmen conspícuo, assim como em brotamentos capilares de lúmens pouco distintos e células isoladas (FIGURA 8). Notou-se em 100% dos casos de LPCG imunorreção ao FvW (TABELA 4), tendo-se uma média da MVC de 16,31, variando de 0,2 a 44.

TABELA 3 – Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-MMP-9 e -VEGF quanto ao tipo celular em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Caso | MMP-9 | | VEGF | |
|------|-------|----|------|----|
| | CG | CM | CG | CM |
| 1 | 3 | 4 | 2 | 4 |
| 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 5 | 1 | 3 | 4 | 2 |
| 6 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 7 | 4 | 4 | 3 | 2 |
| 8 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| 9 | 3 | 4 | 3 | 3 |
| 10 | 4 | 4 | 4 | 1 |
| 11 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| 12 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| 13 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| 14 | 4 | 3 | 4 | 3 |
| 15 | 4 | 1 | 4 | 1 |
| 16 | 1 | 3 | 0 | 1 |
| 17 | 4 | 4 | 4 | 1 |
| 18 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 19 | 2 | 4 | 0 | 0 |
| 20 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: CG – célula gigante multinucleada; CM – célula mononucleada.

TABELA 4 – Distribuição da MVC para o anticorpo anti-FvW em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Caso | MVC |
|-------------|------------|
| 1 | 15,6 |
| 2 | 0,2 |
| 3 | 6,6 |
| 4 | 15,6 |
| 5 | 3,4 |
| 6 | 31,4 |
| 7 | 30,4 |
| 8 | 14 |
| 9 | 15,2 |
| 10 | 28,8 |
| 11 | 31,2 |
| 12 | 1,4 |
| 13 | 44 |
| 14 | 9,6 |
| 15 | 22 |
| 16 | 9,2 |
| 17 | 9 |
| 18 | 11 |
| 19 | 3,8 |
| 20 | 23,8 |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: MVC – contagem microvascular.

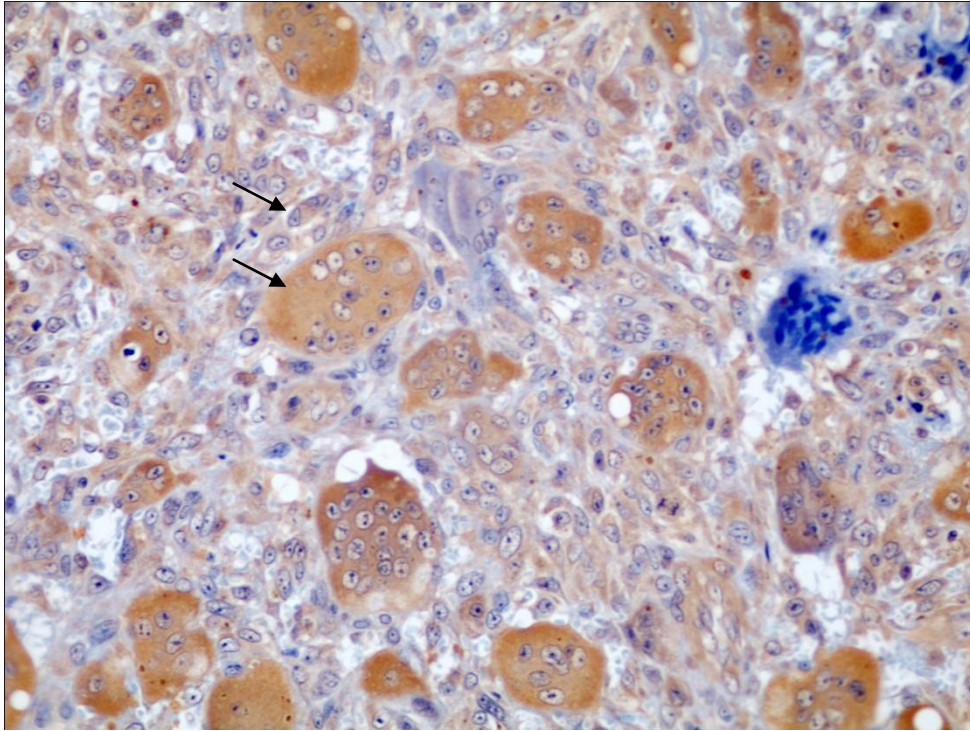


FIGURA 5 – Expressão imuno-histoquímica da MMP-9 em lesão periférica de células gigantes vista em citoplasma de células multinucleadas e células mononucleadas. LSAB (400X).

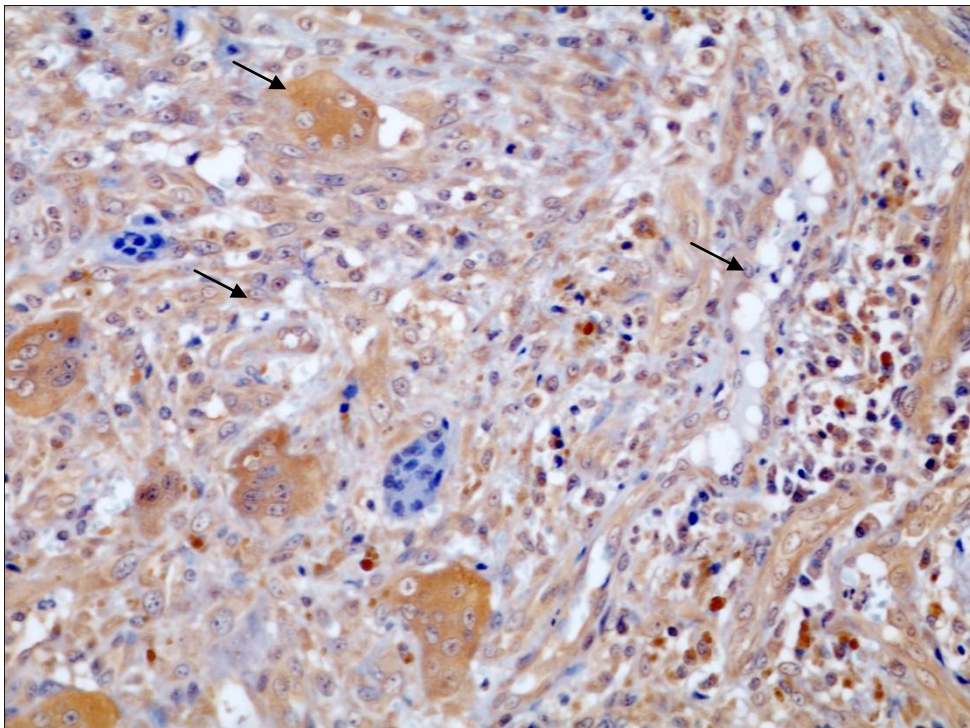


FIGURA 6 – Células endoteliais, células multinucleadas e mononucleadas imunorreativas à MMP-9 em lesão periférica de células gigantes. LSAB (400X).

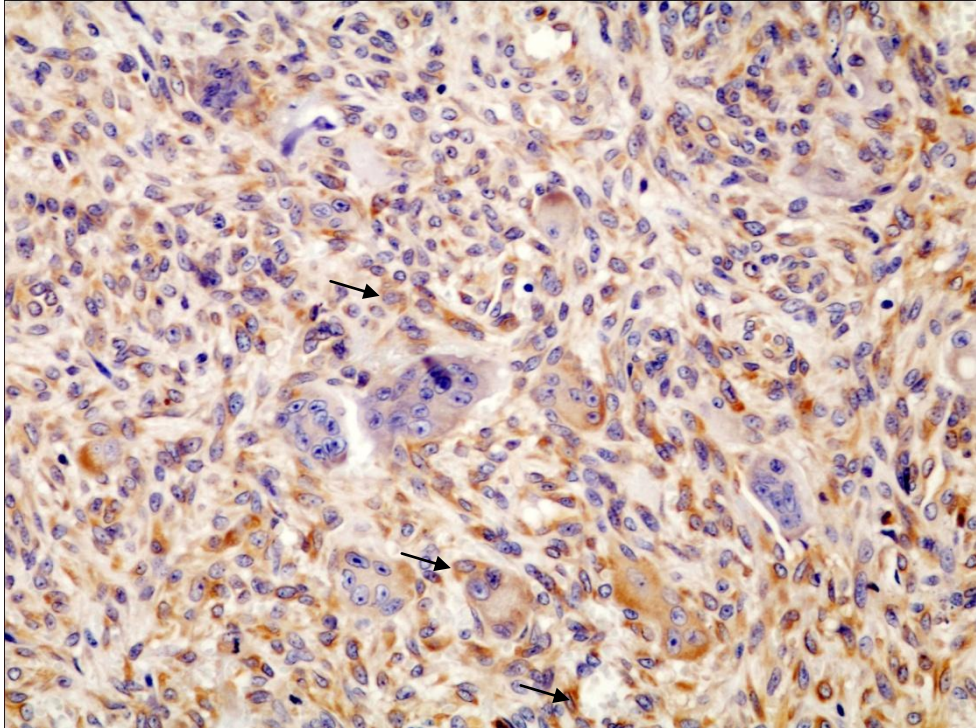


FIGURA 7 – Expressão imuno-histoquímica do VEGF em lesão periférica de células gigantes no citoplasma de células multinucleadas, células mononucleadas e em células endoteliais. LSAB (400X).

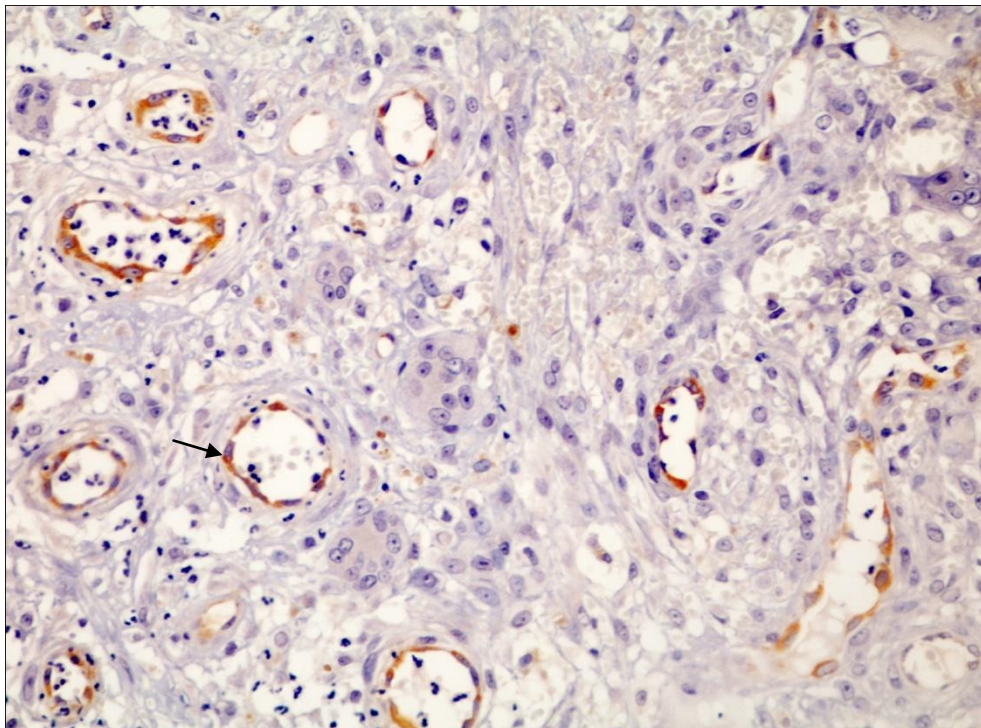


FIGURA 8 – Expressão imuno-histoquímica do FvW em lesão periférica de células gigantes, marcando células endoteliais. LSAB (400X).

5.1.3 Expressão global da MMP-9 e do VEGF nas LCCG e LPCG

Nas LCCG, ao analisar conjuntamente a expressão da MMP-9 nas CG e CM (APÊNDICE G), nota-se que 75% das lesões correspondem ao escore 4 (TABELA 5). Estendendo-se essa análise ao VEGF em ambos os tipos celulares, verifica-se que 60% dos casos possuem o escore 4 (TABELA 5).

Ao reunir os valores das CG e CM para a expressão da MMP-9 nas LPCG (APÊNDICE G), observa-se que 60% apresentam o escore 4. Somando-se o número de células imunorreativas nos dois tipos celulares para o VEGF, verifica-se que 25% das lesões possuem o escore 4 (TABELA 5).

TABELA 5 – Distribuição dos escores da marcação imuno-histoquímica para o anticorpo anti-MMP-9 e -VEGF em lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010

| Caso | LCCG | | LPCG | |
|------|-------|------|-------|------|
| | MMP-9 | VEGF | MMP-9 | VEGF |
| 1 | 1 | 4 | 4 | 4 |
| 2 | 2 | 3 | 2 | 4 |
| 3 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 |
| 5 | 2 | 1 | 3 | 2 |
| 6 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| 7 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| 8 | 3 | 4 | 4 | 3 |
| 9 | 4 | 2 | 4 | 3 |
| 10 | 4 | 4 | 4 | 1 |
| 11 | 4 | 4 | 4 | 0 |
| 12 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| 13 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| 14 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| 15 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 4 | 4 | 3 | 1 |
| 17 | 4 | 3 | 4 | 1 |
| 18 | 4 | 0 | 2 | 2 |
| 19 | 4 | 4 | 4 | 0 |
| 20 | 4 | 4 | 4 | 4 |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN.

5.2 Resultados estatísticos

A análise da hipótese₁, por meio do teste de Mann-Whitney, exibiu os seguintes resultados:

H₁

H_{1.0}: Não há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM intralesionais.

H_{1.1}: Há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM intralesionais.

Uma vez que não houve variação nos escores da expressão da MMP-9 nas CG da LCCG, não se realizou testes estatísticos para essa análise.

Ao comparar as medianas dos escores do VEGF nas CG e CM nas LCCG, não se observou diferença significativa ($p=0.964$) (TABELA 6).

TABELA 6 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para o VEGF, segundo o tipo celular em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Tipo de marcador | Tipo celular | n | Mediana | Q ₂₅ -Q ₇₅ | Soma dos | Média dos | U | p |
|------------------|--------------|----|---------|----------------------------------|----------|-----------|-------|-------|
| | | | | | postos | postos | | |
| VEGF | | | | | | | | |
| | CG | 20 | 4 | 2,25 – 4 | 408,50 | 20,43 | 198,5 | 0.964 |
| | CM | 20 | 4 | 3 – 4 | 411,50 | 20,58 | | |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: CG – célula gigante multinucleada; CM – célula mononucleada.

Semelhantemente, ao comparar as medianas dos escores da expressão do VEGF nas CG e CM do VEGF nas LPCG, não se notou diferença significativa ($p=0.069$) (TABELA 7).

TABELA 7 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para o VEGF, segundo o tipo celular em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Tipo de marcador | Tipo celular | n | Mediana | Q ₂₅ -Q ₇₅ | Soma dos | Média dos | U | p |
|------------------|--------------|----|---------|----------------------------------|----------|-----------|-------|-------|
| | | | | | postos | postos | | |
| VEGF | | | | | | | | |
| | CG | 20 | 4 | 2,25 – 4 | 474,50 | 23,73 | 135,5 | 0.069 |
| | CM | 20 | 2 | 1 – 3,75 | 345,50 | 17,28 | | |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: CG – célula gigante multinucleada; CM – célula mononucleada.

Ao confrontar as medianas dos escores da MMP-9 e do VEGF nas CM das LCCG, não se observa diferença significativa ($p=0.265$) (TABELA 8).

TABELA 8 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para as mononucleadas (CM), segundo o tipo de marcador em lesões centrais de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Tipo celular | Tipo de marcador | n | Mediana | Q₂₅-Q₇₅ | Soma dos postos | Média dos postos | U | p |
|---------------------|-------------------------|----------|----------------|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|----------|----------|
| CM | | | | | | | | |
| | MMP-9 | 20 | 4 | 3,25 – 4 | 445,00 | 22,25 | 165,0 | 0.265 |
| | VEGF | 20 | 4 | 3,5 – 4 | 375,00 | 18,75 | | |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN.

Posteriormente, foi realizada a mesma comparação para as LPCG. Das análises estatísticas, emergem valores de p que mostram diferença significativa entre as medianas dos escores da MMP-9 e do VEGF nas CM ($p=0.009$) (TABELA 9).

TABELA 9 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para as mononucleadas (CM), segundo o tipo de marcador em lesões periféricas de células gigantes. Natal, RN – 2010

| Tipo celular | Tipo de marcador | n | Mediana | Q₂₅-Q₇₅ | Soma dos postos | Média dos postos | U | p |
|---------------------|-------------------------|----------|----------------|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|----------|----------|
| CM | | | | | | | | |
| | MMP-9 | 20 | 4 | 3 – 4 | 501,50 | 25,08 | 108,5 | 0.009 |
| | VEGF | 20 | 2 | 1 – 3,75 | 318,50 | 15,93 | | |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN.

Em seguida, foram computados cálculos para a análise da hipótese₂, por meio do teste de Mann-Whitney, que revelaram os seguintes achados:

H₂

H_{2.0}: Não há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM entre as lesões centrais e periféricas de células gigantes.

H_{2.1}: Há diferenças na expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e do VEGF nas CG e nas CM entre as lesões centrais e periféricas de células gigantes.

Confrontando as medianas dos escores da MMP-9 nas CM entre as LCCG e LPCG, os dados mostram uma diferença não significativa ($p=0.463$) (TABELA 10).

Para o VEGF, ao se fazer um paralelo com as medianas dos escores do VEGF nas CG entre as lesões, não houve distinção significativa ($p=0.905$); todavia, nas CM evidenciou-se uma diferença significativa ($p=0.034$) (TABELA 10), ou seja, no componente mononuclear, as LCCG tinham maior expressão do VEGF do que nas LPCG.

TABELA 10 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores do percentual de células imunorreativas para a MMP-9 e o VEGF, segundo o tipo celular entre lesões centrais de células gigantes (LCCG) e lesões periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010

| Tipo celular | Lesão | N | Mediana | Q ₂₅ -Q ₇₅ | Soma dos | Média dos | U | p |
|--------------|-------|----|---------|----------------------------------|----------|-----------|-------|-------|
| | | | | | postos | postos | | |
| MMP-9 | | | | | | | | |
| CM | LCCG | 20 | 4 | 3,25 – 4 | 432,5 | 21,63 | 177,5 | 0.463 |
| | LPCG | 20 | 4 | 3 – 4 | 387,5 | 19,38 | | |
| VEGF | | | | | | | | |
| CG | LCCG | 20 | 4 | 2,25 – 4 | 414,0 | 20,70 | 196,0 | 0.905 |
| | LPCG | 20 | 4 | 2,25 – 4 | 406,0 | 20,30 | | |
| CM | LCCG | 20 | 4 | 3 – 4 | 485,0 | 24,25 | 125,0 | 0.034 |
| | LPCG | 20 | 2 | 1 – 3,75 | 335,0 | 16,75 | | |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN. Legenda: CG – célula gigante multinucleada; CM – célula mononucleada.

Logo após, foi analisada a hipótese₃, por meio do teste de Mann-Whitney, que demonstrou os seguintes achados:

H₃

H_{3,0}: Não há diferenças na expressão global imuno-histoquímica de cada proteína analisada (MMP-9, VEGF e FvW) entre lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

H_{3,1}: Há diferenças na expressão global imuno-histoquímica de cada proteína analisada (MMP-9, VEGF e FvW) entre lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

Ao se realizar o teste *U* de Mann-Whitney, não se constatou diferenças significativas na expressão da MMP-9 entre as lesões ($p=0.583$). Contudo, houve diferença significativa na

expressão do VEGF, sendo maior nas LCCG ($p=0.038$). Adicionalmente, houve uma maior mediana da MVC para as LPCG ($p=0.049$), embora o valor de p encontrar-se no limiar de significância (TABELA 11).

TABELA 11 – Parâmetros utilizados no cálculo do teste de Mann-Whitney para a avaliação dos escores de células imunorreativas para MMP-9, VEGF e FvW entre lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010

| Lesão | n | Mediana | Q ₂₅ -Q ₇₅ | Soma dos | Média dos | U | p |
|--------------|----|---------|----------------------------------|----------|-----------|-------|-------|
| | | | | postos | postos | | |
| MMP-9 | | | | | | | |
| LCCG | 20 | 4 | 3,25 – 4 | 430,5 | 21,53 | 179,5 | 0.583 |
| LPCG | 20 | 4 | 3 – 4 | 389,5 | 19,48 | | |
| VEGF | | | | | | | |
| LCCG | 20 | 4 | 3 – 4 | 487,0 | 24,35 | 123,0 | 0.038 |
| LPCG | 20 | 2,5 | 1 – 3,75 | 333,0 | 16,65 | | |
| FvW | | | | | | | |
| LCCG | 20 | 5,7 | 4,25 – 11,5 | 337,0 | 16,85 | 127,0 | 0.049 |
| LPCG | 20 | 14,6 | 7,2 – 27,5 | 483,0 | 24,15 | | |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN.

Finalmente, testou-se correlação para verificar a hipótese₄, através do teste de Spearman, que teve os seguintes resultados:

H₄

H_{4.0}: Não há correlação na expressão global imuno-histoquímica da MMP-9, VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

H_{4.1}: Há correlação na expressão global imuno-histoquímica da MMP-9, VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes dos maxilares.

Para a LCCG, não houve correlação significativa entre MMP-9 x VEGF e MMP-9 x FvW ($p>0.05$). Entretanto, percebeu-se correlação negativa significativa entre VEGF x FvW ($p=0.005$) (TABELA 12).

Calculando-se o mesmo teste para as LPCG, não se observa correlação entre VEGF x MMP-9, VEGF x FvW e MMP-9 x FvW.

TABELA 12 – Valores do teste de Spearman para avaliar as correlações dos escores de células imunorreativas para a MMP-9 e o VEGF e da contagem microvascular de vasos imunorreativos ao FvW, em lesões centrais (LCCG) e periféricas de células gigantes (LPCG). Natal, RN – 2010

| Lesão | Variável | N | <i>r</i> | <i>p</i> |
|--------------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|
| LCCG | | | | |
| | VEGF x MMP-9 | 20 | - 0,022 | 0.925 |
| | VEGF x FvW | 20 | - 0,599 | 0.005 |
| | MMP-9 x FvW | 20 | - 0,111 | 0.640 |
| LPCG | | | | |
| | VEGF x MMP-9 | 20 | - 0,041 | 0.864 |
| | VEGF x FvW | 20 | - 0,005 | 0.985 |
| | MMP-9 x FvW | 20 | 0,284 | 0.225 |

Fonte: Arquivos da disciplina de Patologia Oral – UFRN.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As LCCG e LPCG são lesões proliferativas não neoplásicas que acometem o complexo maxilo-mandibular. A LCCG é uma lesão intra-óssea, de etiologia desconhecida, que possui um comportamento clínico variado, desde assintomático, com crescimento lento a um processo sintomático e com expansão rápida (BATAINEH; AL-KHATEEB; RAWASHDEB, 2002; QUINDERÉ et al., 2008). A LPCG ocorre em tecido mole, com provável origem no ligamento periodontal e possui um quadro clínico indolente (CAPELOZZA; TAVEIRA; PAGIN, 2007; CARLI; SILVA; PAZA, 2006; NOGUEIRA et al., 2004; QUINDERÉ et al., 2008; RESENDE et al., 2007). Apesar das diferenças clínicas salientadas, ambas as lesões compartilham características histopatológicas (FLÓREZ-MORENO et al., 2008; SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000). Nota-se a presença de uma quantidade variável de células gigantes multinucleadas, com citoplasma amplo, possuindo poucos ou vários núcleos no seu interior e em meio a esse tipo celular, encontram-se células mononucleadas ovóides e fusiformes com o núcleo mais pálido, diferindo nitidamente das células inflamatórias, como os linfócitos (ITONAGA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2004; QUINDERÉ et al., 2008).

A natureza, bem como a patogenia das LCCG e LPCG ainda são objetos de discussão. Há trabalhos que avaliaram marcadores relacionados à atividade mitótica celular comparando a LCCG com o tumor de células gigantes dos ossos longos (TCG) (SOUZA et al., 1999) e, posteriormente, com LPCG (SOUZA; MESQUITA; GOMES, 2000). Interessantemente, o TCG revelou percentual reduzido de células positivas ao Ki-67 e PCNA quando comparado à LCCG e o último trabalho demonstrou que as LPCG, de forma geral, tinham uma tendência a uma atividade proliferativa maior que as LCCG, embora não demonstrasse diferença significativa. Adicionalmente, estudos no campo da genética, apesar de não conclusivos, não têm demonstrado envolvimento de alterações genéticas para o desenvolvimento de LCCG (CARVALHO et al., 2009; LIETMAN et al., 2007).

Recentemente, Vered, Buchner e Dayan (2006) sugerem que a LCCG não pode ser definida como uma lesão proliferativa vascular.

A respeito da patogenia dessas lesões, sugere-se que monócitos advindos da circulação seriam recrutados para o interior da lesão através de fatores quimiotáticos, tais como a proteína quimiotática de monócito 1, IL-8 e TGF- β (HAQUE; MOATASIM, 2008). Os monócitos seriam estimulados pelo RANKL a se fusionarem e formarem as células gigantes

semelhantes aos osteoclastos, fenótipo esse confirmado em vários trabalhos (ITONAGA et al., 2003; TIFREE; AUFDEMORTE, 1997). Essas células atuam na desmineralização do tecido ósseo, tendo como auxiliar no processo as MMPs (KUMTA et al., 2003). Essa hipótese não é aceita apenas para LCCG, LPCG e TCG, mas também em outras lesões com células gigantes como cisto ósseo aneurismático e o querubismo. Acredita-se que as lesões que apresentam células gigantes compartilham achados similares, assim como fenótipos celulares, podendo compartilhar, então, o mesmo mecanismo de formação das CG, apesar de possuírem etiologias distintas (LIU; YU; LI, 2003).

As MMPs constituem um grupo de endopeptidases proteolíticas zinco-dependente. Elas têm como função degradar matriz extracelular, processar e liberar fatores de crescimento, reparo tecidual e angiogênese (GJERTSSON et al., 2005; GOLDMAN; SHALEV, 2003; LEWIS; SPEIGHT, 1999; ROY; YANG; MOSES, 2009; STERNLICHT; WERB, 2001; UEDA et al., 1996). Pesquisas têm sugerido que as MMPs desempenham um importante papel no processo de invasão tumoral e metástase em função de sua habilidade de degradar constituintes da MEC, facilitando a invasão na membrana basal, a primeira barreira para invasão de células tumorais (ROY; YANG; MOSES, 2009; STERNLICHT; WERB, 2001).

No presente estudo, pesquisou-se a expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-9, VEGF e FvW em LCCG e LPCG, para efeito comparativo entre as duas entidades, histologicamente semelhantes e de comportamento biológico distinto.

Nas LCCG e LPCG, a localização da marcação imuno-histoquímica, bem como os tipos celulares imunomarcados para a MMP-9, VEGF e FvW concordam com outros estudos descritos na literatura (CARLILE et al., 2001; RAO et al., 1999; RUIZ, 2008; UEDA et al., 1996; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006; ZHENG et al., 2000).

A MMP-9 tem como substrato o colágeno IV, principal componente da membrana basal que envolve os vasos (UEDA et al., 1996). Ela o degrada e aumenta a eficiência da proliferação das células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico ao expor sítios de ligação de integrinas como a $\alpha_v\beta_3$ (RUNDHAUG, 2005). Na remodelação óssea a presença desta MMP é essencial para invasão dos osteoclastos e de células multinucleadas (ENGSIG et al., 2000). A referida MMP é capaz de degradar a porção não mineralizada óssea, pois é uma enzima proteolítica muito eficiente para clivar colágeno I e II dos componentes orgânicos desmineralizados do osso (KUMTA et al., 2003). Adicionalmente, auxilia na liberação do VEGF ligado à MEC, permitindo um aumento na vascularização que, por conseguinte, permite a chegada de mais células precursoras de osteoclastos (RUNDHAUG, 2005). A MMP-9 é produzida por diversos tipos celulares, tais como células inflamatórias e células

mesenquimais, como as endoteliais, fibroblastos e osteoblastos (MATTU et al., 2000; XU et al., 2005).

Nesse estudo, a MMP-9 mostrou imunorreatividade em mais de 75% das células gigantes em 100% dos casos de LCCG e 65% de LPCG, semelhantemente ao observado nas CM de ambas as lesões (75% e 60%, respectivamente), embora sem diferença significativa ($p>0.05$).

As CG produzem IL-1 β e TNF- α que estimulam as CM a produzirem MMP-9. Rao et al. (1999) verificaram que a expressão de MMP-9 também está intimamente relacionada com a quantidade de CM. Utilizando uma cultura de células de um TCG, os pesquisadores observaram que havia uma redução na expressão do RNAm da MMP-9, a medida que diminuía o número de CG a cada passagem do meio de cultura. Adicionalmente, a pesquisa demonstrou que ao adicionar-se um anticorpo neutralizante da IL-1 β , a expressão da MMP-9 era parcialmente bloqueada, e que as células mononucleadas eram estimuladas a produzir a MMP-9 ao acrescentar-se a referida interleucina. Embora o componente multinucleado não seja considerado responsável pelo diferente padrão de comportamento biológico, os pesquisadores sugerem a existência de uma interação entre as CG e CM determinante no comportamento mais agressivo do TCG.

Ainda no tocante aos tipos celulares, tem-se verificado que as CM têm um comportamento proliferativo maior que as CG (RAO et al., 1999) e isso poderia ser responsável pelo comportamento biológico distinto entre as lesões (LIU; YU; LI, 2003). Vários trabalhos que almejam traçar um fenótipo para as CG, sugeriram que as mesmas pertencem a uma linhagem macrófágica, pois as células eram imunorreativas ao anticorpo anti-CD68 (FLÓREZ-MORENO et al., 2008; LIU; YU; LI, 2003; O'MALLEY et al., 1997; TIFEE; AUFDEMORTE, 1997). Sabe-se que os macrófagos liberam algumas citocinas, dentre elas interleucinas, como a IL-1 β e o VEGF, o que favorece a suposição de que uma maior expressão de CG CD68+ poderia estar associada aos aspectos clínicos mais agressivos da LCCG (FLÓREZ-MORENO et al., 2008).

Alguns estudos analisaram a expressão imuno-histoquímica do CD68 em LCCG e LPCG. Liu, Yu e Li (2003) verificaram que havia um percentual ligeiramente maior de células positivas nas LCCG, apesar de não ser significativo. Entretanto, Flórez-Moreno et al. (2008) constataram um maior número significativo de células imunorreativas ao CD68 nas LCCG. Além disso, uma pesquisa comparando o mesmo marcador entre LCCG e TCG (ARAGÃO et al., 2007) e outro estudo entre LCCG agressivas e não agressivas (O'MALLEY et al., 1997) não verificaram divergências significativas. Assim, observa-se uma tendência das

LCCG produzirem maior quantidade de MMP-9, uma vez que essas lesões exibem maior número de células CD68+ e, dessa forma, essa endopeptidase estaria mais envolvida na clivagem dos constituintes orgânicos desmineralizados (LIU; YU; LI, 2003). No atual estudo, apesar das LCCG apresentarem mais células imunorreativas à MMP-9 do que nas LPCG, a diferença não foi suficiente para apresentar significado estatístico ($p=0.583$).

Liu, Yu e Li (2003) ao avaliarem a expressão imuno-histoquímica da MMP-9 em 34 LCCG e 6 LPCG nos dois componentes celulares, observaram que as CG em ambas as lesões exibiram um percentual de positividade muito próximo (94,6% e 93,3%, respectivamente), assim como as CM (12,8% e 12%). No atual trabalho, não foi possível realizar testes estatísticos para os escores do componente multinucleado imunomarcado para a MMP-9 e diferenciá-lo entre as lesões, pois o mesmo foi constante nas LCCG, apesar dos achados corroborarem as assertivas de Liu, Yu e Li (2003). Contudo, nas CM, 75% das LCCG e 60% das LPCG apresentaram escore 4, ou seja, mais de 75% das células imunorreativas; dessa forma, esses resultados se afastam dos encontrados no estudo supracitado.

O VEGF é uma molécula solúvel de mecanismo de atuação autócrino e parácrino que compreende uma família de proteínas multifuncionais que estão envolvidas na angiogênese fisiológica ou patológica (FERRARA, 2004; MITROU et al., 2009). A angiogênese é um processo de formação de novos vasos a partir de endotélio pré-existente e o VEGF induz um aumento de permeabilidade vascular, assim como atividade mitogênica das células endoteliais. Esse processo é fundamental no desenvolvimento embrionário e no ciclo reprodutivo. Além disso, é vital em condições patológicas como o câncer, artrite reumatóide, retinopatias e psoríase (FERRARA, 2004; NIIDA et al., 1999; SEGHEZZI et al., 1998; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007). O VEGF é produzido por monócitos e macrófagos ativados (ZHENG et al., 2000).

Embora a produção de VEGF tenha sempre sido relacionada com a angiogênese, ele pode ter outras funções biológicas (ZHENG et al., 2000). Tem-se sugerido um papel adicional à referida proteína: a formação de osteoclastos (ENGSIG et al., 2000; NIIDA et al., 1999). Niida et al. (1999) demonstraram que a administração de VEGF induz a formação de osteoclastos em ratos osteopetróticos. Assim, o VEGF além de estimular a angiogênese local para aumentar o aporte de células precursoras osteoclásticas, atuaria na diferenciação osteoclástica em cooperação com RANKL, uma vez que foi demonstrado que essas células possuem receptores para o VEGF de maneira similar às CM com linhagem macrofágica. Além disso, na ausência funcional do fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), o VEGF é responsável pelo recrutamento de osteoclastos.

Em uma pesquisa conduzida por Vered, Buchner e Dayan (2006) analisaram a expressão imuno-histoquímica do VEGF em 41 casos de LCCG e verificaram que 95% das lesões apresentaram imunorreatividade nos dois componentes celulares. Na atual amostra, verificou-se percentual equivalente de casos (95%) positivos à proteína nas CG e CM, estando de acordo com os achados dos autores supracitados. Ainda com relação ao trabalho citado, cerca de 73% dos casos apresentaram mais de 75% das CG positivas e cerca de 50% para as CM positivas. Na presente investigação, 55% da amostra mostraram mais de 75% das CG e CM positivas, que se aproximam dos dados na literatura.

Estudos com tumores ósseos primários malignos e benignos têm demonstrado que há muitas células envolvidas na formação e na reabsorção óssea. O VEGF já foi identificado em osteoblastos e células semelhantes aos osteoclastos em osteoblastoma, em CG e CM de sarcomas osteogênicos (SULZBACHER et al., 2002) e de TCG (KUMTA et al., 2003). A alta vascularização tem sido considerada como um potencial marcador metastático e de pobre prognóstico em vários tipos de tumores, incluindo o TCG. Alguns trabalhos associaram esse fenômeno com a agressividade do comportamento clínico (KUMTA et al., 2003; ZHENG et al., 2000). Com relação ao TCG, a alta expressão de VEGF foi associada a graus avançados dessa lesão, já que as lesões que tiveram recorrência mostraram altas médias de expressão de RNAm do VEGF (KUMTA et al., 2003).

A LCCG e o TCG compartilham duas características: são lesões osteolíticas e possuem um considerável número de CG e CM positivas aos fatores angiogênicos. É proposta uma conexão entre angiogênese e o processo de reabsorção óssea (FOLKMAN, 2002; VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). O aumento da reabsorção e remodelação óssea coincide com a angiogênese no desenvolvimento ósseo fisiológico, assim como em doença periodontal e artrite reumatóide. Isso poderia ser elucidado pelo fato de que a maior quantidade de vasos sanguíneos aumentaria a oferta de células precursoras osteoclásticas à área. Essas células migrariam para o íntimo da lesão e atuariam na reabsorção óssea (VERED; BUCHNER; DAYAN, 2006). Ao se comparar a expressão do VEGF entre as lesões, os dados mostraram que as CM das LCCG exibiram expressão significativamente maior que das LPCG ($p=0.034$) e uma maior expressão global deste marcador nas LCCG ($p=0.038$). Assim, provavelmente, a osteoclastogênese parece ser o evento mais proeminente que a angiogênese para explicar a maior expressão desse fator, pois o mesmo pode ser quimiotático para os osteoclastos (ENGSID et al., 2000).

Para investigar se as LCCG e as LPCG exibiriam diferenças em sua vascularização, realizou-se a mensuração vascular através da utilização do FvW que é específico para células

endoteliais. Esta mensuração é considerada um indicador do potencial angiogênico (RUIZ, 2008). Ainda que existam opiniões conflitantes em relação à indicação do marcador imuno-histoquímico que ofereça melhores resultados na quantificação da vascularização, o anticorpo anti-FvW é o mais recomendado (CARLILE et al., 2001; SOUZA; FREITAS; MIRANDA, 2007). Neste experimento, todos os casos de LCCG e LPCG exibiram marcação positiva para o anticorpo anti-FvW (MVC de 0,2 a 44,8).

Lim e Gibbins (1995) realizaram um estudo que tinha como objetivo principal traçar um perfil fenotípico dos componentes celulares das LCCG, LPCG e TCG através de marcadores imuno-histoquímicos e observaram um achado interessante: o padrão de organização e diferenciação dos vasos sanguíneos nessas lesões. Primeiramente, verificaram que o componente mononuclear exibiu marcação para o antígeno comum leucocitário e as células gigantes para MB1 (marcador de células precursoras osteoclásticas e de linfócitos B), mas sem diferenças entre as três lesões. Posteriormente ao verificar marcação para o fator VIII, que é específico para células endoteliais, notaram que na periferia das lesões ele encontrava-se mais expresso e na intimidade das mesmas, adjacente às células gigantes, não se encontrava expresso. Na análise ultraestrutural com microscopia eletrônica de transmissão, foi revelado que as células endoteliais na periferia estavam bem formadas, com proeminente membrana basal e junções intercelulares. Na porção mais íntima das lesões, não foram encontrados vasos com estruturas completas, exceto células endoteliais com difícil reconhecimento.

Sob outro foco, Quinderé et al. (2008) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de proteínas da MEC em 16 casos de LCCG e 8 de LPCG. Os autores notaram uma fraca positividade do colágeno IV ao longo da membrana basal de vasos sanguíneos presentes em porções profundas das LCCG e LPCG, sugerindo a presença de estruturas vasculares mal formadas ou imaturas. Além disso, nos vasos sanguíneos situados na periferia das LPCG, a expressão imuno-histoquímica intensa e contínua da fibronectina nas membranas basais, indicou uma maior vascularização.

Vered, Buchner e Dayan (2006) mensuraram a vascularização de LCCG e perceberam que nas áreas profundas da lesão houve uma baixa vascularização significativamente menor que nas áreas inflamatórias.

No presente trabalho, a mensuração foi realizada apenas na área da lesão. A MVC apresentou uma maior média nas LPCG (16,31) do que nas LCCG (9,48), sendo esta diferença significativa ($p=0.049$), apesar de estar no limiar de significância. Vale salientar que o FvW não distingue vasos maduros de recém-formados (CARLILE et al., 2001). Uma

possível explicação para este fato seria que, sendo as LPCG um processo reacional, fatores irritantes locais que desencadeiam uma maior resposta inflamatória local (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000) proporcionariam maior liberação de citocinas, como a IL-1, IL-8, TGF- β , estimulando a angiogênese (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Por conseguinte, isso resultaria em uma maior vascularização no microambiente da lesão.

Traçando-se um paralelo com a MMP-9 e o VEGF, essas proteínas podem atuar em conjunto sob dois prismas distintos: na angiogênese e na osteoclastogênese (KUMTA et al., 2003; UEDA et al., 1996; ZHENG et al., 2000).

Em linhas gerais, após o estímulo da angiogênese em quadros de hipóxia, células mesenquimais produzem o VEGF e este atua diretamente nas células endoteliais. Concomitantemente, para que as células endoteliais possam migrar livremente pela MEC, há a produção de algumas MMP-s, dentre elas a MMP-9 que degrada constituintes da MEC e a membrana basal que compõe os vasos sanguíneos. Além disso, essa protease libera mais VEGF que se encontra ligado à MEC através da clivagem da ligação do mesmo com o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (KUNDHAUG, 2005). Nas LPCG foi constatado que houve uma maior expressão de MMP-9 nas CM, em comparação ao VEGF ($p=0.009$). Para compreender melhor este achado, deve-se ressaltar que a MMP-9 regula negativamente a angiogênese, pois ao degradar a MEC, há liberação de fragmentos proteolíticos com atividade anti-angiogênica como a angiostatina, endostatina e tumstatina, que possivelmente, já reduziriam a liberação de VEGF (CORNELIUS et al., 1998; KUMTA et al., 2003).

No contexto da osteoclastogênese, a destruição do osso mineralizado é mediada através da ação de osteoclastos que atuam sobre a matriz óssea mineralizada e outras enzimas como a MMP-9 (KUMTA et al., 2003). A MMP-9 atua na matriz cartilaginosa não mineralizada do osso, facilitando a migração de osteoclastos em direção à superfície óssea (UEDA et al., 1996). O VEGF atua no recrutamento de células precursoras osteoclásticas, assim como na diferenciação das mesmas em osteoclastos (NIIDA et al., 1999).

Jobim et al. (2008) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de ambas as proteínas em câncer de mama e observou correlação positiva significativa entre VEGF e MMP-9. Não foi evidenciado correlação entre a expressão de VEGF e vascularização no estudo conduzido por Ruiz (2008) na avaliação da expressão de MMP-9, VEGF e FvW em lesões periapicais de natureza inflamatória. Ressalta-se, evidentemente, que o contexto dos trabalhos supracitados difere da atual pesquisa. Os dados do presente trabalho não revelam correlação significativa entre VEGF e MMP-9 nas LCCG e LPCG.

Contudo, Zheng et al. (2000) ao analisar a expressão genética do VEGF por meio da RT-PCR em TCG, constataram que o VEGF correlacionou-se positivamente com os estágios clínicos da doença, embora não apresentasse correlação com a vascularização. Porém, achados díspares são reportados por Yamamoto et al. (1998) e Torimura et al. (1998) que, através da mesma técnica, não observaram correlação entre o VEGF e os estágios clínicos do carcinoma gástrico e hepatocelular, respectivamente. Adicionalmente, Carlile et al. (2001), os quais estudando, através da imuno-histoquímica, a expressão do VEGF e do FvW por meio da MVV em espécimes de mucosa oral normal, displasia epitelial e carcinoma epidermóide oral, constataram uma correlação negativa significativa entre o VEGF e a MVV.

Os dados da presente pesquisa demonstram uma correlação negativa significativa entre o VEGF e FvW nas LCCG ($p=0.005$), apesar da ausência da correlação nas LPCG, achados similares obtidos por Carlile et al. (2001). Em conjunto, esses resultados denotam que o número de vasos não é necessariamente correlacionado com o grau de angiogênese, bem como a expressão do VEGF, uma vez que a produção do VEGF pode estar associada a outro contexto biológico, como a reabsorção óssea. Zheng et al. (2000) sugerem que a expressão do VEGF poderia estar associada com a formação de CG semelhantes aos osteoclastos e nas áreas onde há maior expressão do VEGF, provavelmente estaria envolvido na angiogênese, bem como estimulando a osteoclastogênese.

Sabendo-se da importância das funções desempenhadas pela MMP-9 e pelo VEGF no processo de formação de novos vasos e na reabsorção óssea e embasando-se nos achados da presente pesquisa, propõe-se que a tendência da maior imunoexpressão das referidas proteínas observadas nas LCCG possa ser explicada pelo maior envolvimento de ambas na osteoclastogênese. Salienta-se que as LPCG, ocasionalmente, podem provocar reabsorção óssea; porém, em menores intensidade e agressividade, indício que justifica a menor expressão da MMP-9 e do VEGF nessas lesões. Embora as LCCG e as LPCG não sejam lesões proliferativas vasculares, a maior vascularização observada nas LPCG pode estar associada a sua natureza reacional diante a fatores irritantes locais, em que o processo inflamatório contribuiu para a maior formação de vasos.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste experimento conclui-se que:

1. A expressão imuno-histoquímica do VEGF é significativamente maior nas LCCG, particularmente nas CM e observa-se uma tendência à maior imunoexpressão da MMP-9 também nestas lesões, embora não significativa estatisticamente. Estes achados sugerem que a expressão destas proteínas pode estar mais relacionada com o processo de osteoclastogênese fundamental ao crescimento destas lesões.

2. O grau de vascularização mostrou-se significativamente maior nas LPCG, fato este que pode estar relacionado diretamente com a natureza reacional das primeiras, em que o processo inflamatório com sua rica angiogênese contribui sobremaneira para estes achados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ARAGÃO, M. S. et al. Central giant cell granuloma of the jaws and giant cell tumor of long bones – an immunohistochemical comparative study. **J. Appl. Oral Sci.**, v.15, n.4, p.310-316, 2007.

ARDONATO, M.; PATICOFF, K. Intralesional corticosteroid injection for treatment of central giant-cell granuloma. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 132, p. 186-90, 2001.

BANNIKOV, G. A. et al. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.18, p.16022-16027, 2002.

BATAINEH, A. B.; AL-KHATEEB, T.; RAWASHDEB, M.A. The surgical treatment of central giant cell granuloma of the mandible. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.60, p.756-761, 2002.

BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1755, n.1, p.37-69, 2005.

CAMELO, S. F. S. **Granuloma central de células gigantes: revisão de literatura e relato de caso clínico**. 2007. 70f. Monografia (especialização em Radiologia Odontológica e Imaginologia Dento-Maxilo-Facial) – Universidade Paulista, DF.

CAPELOZZA, A. L. A.; TAVEIRA, L. A. A.; PAGIN, O. Lesão periférica de células gigantes: relato de caso. **Salusvita**, v.26, n.1, p.99-104, 2007.

CARLI, J. P.; SILVA, S. O.; PAZA, A. Lesão de células gigantes periférica: revisão de literatura e relato de um caso recidivante. **Rev. Odontol. Araçatuba**, v.27, n.1, p.19-24, 2006.

CARLILE, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumor progression and field cancerisation. **J. Oral Pathol. Med.**, v.30, p.449-457, 2001.

CARVALHO, V. M. et al. Novel mutations in the *SH3BP2* gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. **Oral Dis.**, v.15, p.106-10, 2009.

*Segundo a normalização realizada pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT-NBR 6023:2002)

COLLINS A. Experience with anti-angiogenic therapy of giant cell granuloma of the facial bones. **Ann. R. Australas. Coll. Dent. Surg.**, v.15, p.170–5, 2000.

CORNELIUS, L. A. et al. Metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. **J. Immunol.**, v.161, n.12, p.6845-6852, 1998.

COWAN, R. W. et al. Collagenase expression and activity in the stromal cells from giant cell tumour of bone. **Bone**, v.44, p.865-871, 2009.

DELAISSÉ, J. M. et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clin. Chim. Acta**, v.291, p. 223–234, 2000.

DOUSSIS, I. A.; PUDDLE, B.; ATHANASOU, N. A. Immunophenotype of multinucleated and mononuclear cells in giant cell lesions of bone and soft tissue. **J. Clin. Pathol.**, v.45, p.398-404, 1992.

EGEBLAD, GL; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, n.3, p.161-174, 2002.

ENGSIG, M. T. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. **J. Cell Biol.**, v.151, n.4, p.879-889, 2000.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Rev.**, v.25, n.4, p.581-611, 2004.

FERREIRA, F. C.; CAVEZZI JÚNIOR, O. Granuloma periférico de células gigantes com ossificação. **Rev. Gaúcha Odontol.**, v.42, n.6, p.337-8, 1994.

FLÓREZ-MORENO, G. A. et al. Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.105, p.625-632, 2008.

FOLGUERAS, A. R. et al. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. **Int. J. Dev. Biol.**, v.48, n.5-6, p.411-424, 2004.

FOLKMAN, J. Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws (comment). **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.60, p.1111–1113, 2002.

FRANCO, R. L. et al. Granuloma central de células gigantes: revisão de literatura. **Rev. Bras. Patol. Oral**, v.4, n.2, p. 10-16 , 2003.

FRIDMAN, R. et al. Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). **Cancer Metastasis Rev.**, v.22, n.2-3, p.153-166, 2003.

GEORGE, S. J.; DWIVEDI, A. MMPs, cadherins, and cell proliferation. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.14, p.100-5, 2004.

GEORGES, S. et al. Proteases and bone remodeling. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.20, p.29-41, 2009.

GOLDMAN, S.; SHALEV, E. The role of matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.111, n.2, p.109-121, 2003.

GOMES, A. C. A. et al. Lesão de células gigantes: um estudo retrospectivo de 58 casos. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.**, v.7, n.2, p.83-88, 2007.

GJERTSSON, I. et al. Metalloproteinase-7 contributes to joint destruction in *Staphylococcus aureus* induced arthritis. **Microbial Pathogenesis**, v.38, n.2, p.97-105, 2005.

HAQUE, A. U.; MOATASIM, A. Giant cell tumor of bone: a neoplasm or a reactive condition? **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v.1, p.489-501, 2008.

HOLBORN, M. et al. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.48, n.9, p.4360-7, 2007.

IMAI, Y. et al. Amisense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.40, p.632-638, 2003.

ITONAGA, I. et al. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. **J. Oral Pathol. Med.**, v.32, p.224-231, 2003.

JOBIM, F. C. et al. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.30, n.6, p.287-293, 2008.

KABAN, L. B. et al. Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon alpha-2a. **Pediatrics**, v.103, n.6, p.1145-9, 1999.

KABAN, L. B. et al. Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.60, p.1103-1111, 2002.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral: texto, atlas e correlações clínicas**. São Paulo: Panamericana, 1999.

KERR, J.B. **Atlas de histologia funcional**. São Paulo:Ed.Artes Medicas, 2000.

KRANE, S. M.; INADA, M. Matrix metalloproteinases and bone. **Bone**, v.43, p.7-18, 2008.

KRUSE-LOSLER, B.; DIALLO, R.; GAETNER, C. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinical, radiologic and histopathologic study of 26 cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 101, p. 346- 54, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia – bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUMTA, S. M. et al. Expression of VEGF and MMP-9 in giant cell tumor of bone and other osteolytic lesions. **Life Sci.**, v.73, p.1427-1436, 2003.

LANGE, J.; AKKER, H. P.; BERG, H. Central Giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.104, n.5, p.603-615, 2007.

LEWIS, M. P.; SPEIGHT, P. M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncol.**, v.35, n.3, p.227-233, 1999.

LIETMAN, S.A. et al. SH3BP2 is rarely mutated in exon 9 in giant cell lesions outside cherubism. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.459, p.22–27, 2007.

LIM, L.; GIBBINS, J. R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.79, n.2, p.190-198, 1995.

LIU, B.; YU, S.; LI, T. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J. Oral Pathol. Med.**, v.32, p.367-375, 2003.

MAEDA, K. S. et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **Br. J. Cancer**, v.72, n.2, p.319-323, 1995.

MATTU, T. S. et al. O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: implications for the domain organization of the enzyme. **Biochem.**, v.39, n.51, p.15695-15704, 2000.

MITROU, G. K. et al. Odontogenic keratocyst expresses vascular endothelial growth factor: an immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, v.38, p.470-475, 2009.

MOOK, O. R. F.; FREDERICKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Biochim. Biophys Acta**, v.1705, n.2, p.69-89, 2004.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.16, p.558-564, 2004.

NIIDA, S. et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. **J. Exp. Med.**, v.190, n.2, p.293-298, 1999.

NOGUEIRA, R. L. M. et al. Lesão de células gigantes: um estudo do diagnóstico diferencial em 4 casos clínicos. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.**, v.4, n.2, p.81-89, 2004.

NOLETO, J. W. et al. Aspectos radiológicos e epidemiológicos do granuloma central de células gigantes. **Radiol. Bras.**, v.40, n.3, p.167-171, 2007.

OLINER, J.D. et al. Amplification of gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. **Nature**, v.358, p.80-83, 1992.

O'MALLEY, M. et al. Central giant cell granulomas of the jaws: phenotype and proliferation-associated markers. **J. Oral Pathol. Med.**, v.26, p.159-163, 1997.

PAMMER, J. et al. Expression of regulatory apoptotic proteins in peripheral giant cell granulomas and lesions containing osteoclast-like giant cells. **J. Oral Pathol. Med.**, v.27, p.267-71, 1998.

PAZOUKI, S. et al. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. **J. Pathol.**, v.183, p.39-43, 1997.

PEPPER, M. S. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.17, n.4, p.605-619, 1997.

QUINDERÉ, L. B. et al. Expressão imuno-histoquímica de colágeno IV, tenascina-C e fibronectina em lesões centrais e periféricas de células gigantes. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**, v.26, n.2, p.226-231, 2008.

RAO, V. H. et al. Interleukin-1 β upregulates mmp-9 expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.19, n.10, p.1207-1217, 1999.

RESENDE, C. R. S. et al. Granuloma periférico de células gigantes – imunohistoquímica anti-TNF-alfa. **R. Periodontia**, v.17, n.4, p.104-111, 2007.

ROY, R.; YANG, J.; MOSES, M. A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J. Clin. Oncol.**, v.27, n.31, p.5287-5297, 2009.

RUIZ, P. A. **Expressão imuno-histoquímica da MMP-9, VEGF e FVW em granulomas periapicais, cistos periapicais e cistos periapicais residuais.** 2008. 152f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, DF.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J. Cell Mol. Med.**, v.9, n.2, p.267-285, 2005.

SAW, S. et al. Giant cell tumor and central giant cell reparative granuloma of the skull: do these represent ends of a spectrum? a case report and literature review. **Pathol. Oncol. Res.**, v.15, n.2, p. 291-5, 2009.

SEGHEZZI, G. et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **J. Cell Biol.**, v.141, n.7, p.1659-1673, 1998.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. **Cienc. Odontol. Bras.**, v.10, n.1, p.12-18, 2007.

SOUZA, P. E. A. et al. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. **J. Oral Pathol. Med.**, v.28, n.2, p.54-58, 1999.

SOUZA, P. E. A.; MESQUITA, R. A.; GOMEZ, R. S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis.**, v.6, p.35-39, 2000.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p.463-516, 2001.

SULZBACHER, I. et al. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. **Virchows Arch.**, v.441, p.345-349, 2002.

THOMAS, G. T.; LEWIS, M. P.; SPEIGHT, P. M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncol.**, v.35, n.3, p. 227-233, 1999.

TIFFEE, J. C.; AUFDEMORTE, T. B. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.55, p.1108-1112, 1997.

TORIMURA, T. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. **Hum. Pathol.** v.29, p.986-991, 1998.

UEDA, Y. et al. Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion. **Am. J. Pathol.**, v.148, n.2, p. 611-621, 1996.

VERED, M.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Giant cell granuloma of the jawbones – a proliferative vascular lesion? Immunohistochemical study with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. **J. Oral Pathol. Med.**, v.35, p.613-619, 2006.

VERED, M. et al. Calcitonin nasal spray for treatment of central giant cell granuloma: Clinical, radiological, and histological findings and immunohistochemical expression of calcitonin and glucocorticoid receptors. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.104, p.226-239, 2007.

XU, X. et al. Functional basis for the overlap in ligand interactions and substrate specificities of matrix metalloproteinases-9 and -2 (MMP-9 and MMP-2). **Biochem. J.**, v.392, p.127-134, 2005.

YAMAMOTO, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human gastric carcinomas. **Pathol. Int.**, v.48, p.499-506, 1998.

YAN, C.; BOYD, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J. Cell Physiol.**, v.211, p.19-26, 2007.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.1-8, 1991.

ZHANG, W. et al. Reactive gingival lesions: a retrospective study of 2.439 cases. **Quintessence Int.**, v.38, p.103-110, 2007.

ZHENG, M. H. et al. Gene expression of vascular endothelial growth factor in giant cell tumors of bone. **Hum. Pathol.**, v.31, n.7, p. 804-812, 2000.

ZUCKER, S. et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. **Int. J. Cancer**, v.75, n.5, p.780-786, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha para coleta de dados LCCG**Características clínicas das LCCG**

| Caso | Gênero | Raça | Idade | Localização anatômica |
|-------------|---------------|-------------|--------------|------------------------------|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |
| 11 | | | | |
| 12 | | | | |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | | | | |
| 16 | | | | |
| 17 | | | | |
| 18 | | | | |
| 19 | | | | |
| 20 | | | | |

APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados LPCG**Características clínicas das LPCG**

| Caso | Gênero | Raça | Idade | Localização anatômica |
|-------------|---------------|-------------|--------------|------------------------------|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |
| 11 | | | | |
| 12 | | | | |
| 13 | | | | |
| 14 | | | | |
| 15 | | | | |
| 16 | | | | |
| 17 | | | | |
| 18 | | | | |
| 19 | | | | |
| 20 | | | | |

APÊNDICE D – Ficha de avaliação da expressão imuno-histoquímica do FvW

Lesão: () LCCG; () LPCG

| Lamina | Campo 1 | Campo 2 | Campo 3 | Campo 4 | Campo 5 | Média |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | | | | | | |
| 18 | | | | | | |
| 19 | | | | | | |
| 20 | | | | | | |

**APÊNDICE E – Parâmetros utilizados no cálculo do percentual de CG e CM positivas
ao VEGF e MMP-9 nas LCCG**

| Caso | MMP-9 | | | | | | VEGF | | | | | |
|------|-------|-----|---------|------|------|--------|------|-----|---------|------|------|--------|
| | CG | | | CM | | | CG | | | CM | | |
| | P | T | % | P | T | % | P | T | % | P | T | % |
| 1 | 92 | 104 | 88,46% | 93 | 6346 | 1,47% | 89 | 126 | 70,63% | 4716 | 5577 | 84,56% |
| 2 | 150 | 159 | 94,34% | 2764 | 5676 | 48,70% | 93 | 99 | 93,94% | 2552 | 3626 | 70,38% |
| 3 | 50 | 59 | 84,75% | 2854 | 3251 | 87,79% | 65 | 84 | 77,38% | 2696 | 3797 | 71,00% |
| 4 | 143 | 153 | 93,46% | 316 | 3326 | 9,50% | 209 | 209 | 100,00% | 1373 | 1850 | 74,22% |
| 5 | 97 | 125 | 77,60% | 670 | 2128 | 31,48% | 20 | 48 | 41,67% | 63 | 2803 | 2,25% |
| 6 | 131 | 131 | 100,00% | 2409 | 2853 | 84,44% | 123 | 128 | 96,09% | 3522 | 4623 | 76,18% |
| 7 | 109 | 115 | 94,78% | 2813 | 3137 | 89,67% | 5 | 36 | 13,89% | 5793 | 5872 | 98,65% |
| 8 | 128 | 133 | 96,24% | 2108 | 3211 | 65,65% | 125 | 138 | 90,58% | 4600 | 4948 | 92,97% |
| 9 | 18 | 22 | 81,82% | 3677 | 3844 | 95,66% | 10 | 13 | 76,92% | 1449 | 3179 | 45,58% |
| 10 | 80 | 86 | 93,02% | 3921 | 4208 | 93,18% | 68 | 72 | 94,44% | 5468 | 6250 | 87,49% |
| 11 | 105 | 105 | 100,00% | 2480 | 2646 | 93,73% | 48 | 50 | 96,00% | 1988 | 2338 | 85,03% |
| 12 | 62 | 75 | 82,67% | 3301 | 3643 | 90,61% | 59 | 116 | 50,86% | 2825 | 3672 | 76,93% |
| 13 | 74 | 95 | 77,89% | 3291 | 3872 | 84,99% | 52 | 62 | 83,87% | 7102 | 7201 | 98,63% |
| 14 | 93 | 101 | 92,08% | 3279 | 3405 | 96,30% | 85 | 105 | 80,95% | 1456 | 2268 | 64,20% |
| 15 | 48 | 48 | 100,00% | 1013 | 1238 | 81,83% | 33 | 66 | 50,00% | 626 | 5522 | 11,34% |
| 16 | 121 | 129 | 93,80% | 3470 | 4237 | 81,90% | 59 | 69 | 85,51% | 2938 | 3251 | 90,37% |
| 17 | 100 | 100 | 100,00% | 4303 | 4386 | 98,11% | 63 | 88 | 71,59% | 3095 | 4180 | 74,04% |
| 18 | 172 | 173 | 99,42% | 6061 | 6103 | 99,31% | 0 | 82 | 0,00% | 0 | 5833 | 0,00% |
| 19 | 100 | 104 | 96,15% | 6267 | 6317 | 99,21% | 48 | 98 | 48,98% | 4417 | 4961 | 89,03% |
| 20 | 86 | 97 | 88,66% | 2610 | 2802 | 93,15% | 22 | 40 | 55,00% | 2971 | 3813 | 77,92% |

**APÊNDICE F – Parâmetros utilizados no cálculo do percentual de CG e CM positivas
ao VEGF e MMP-9 nas LPCG**

| Caso | MMP-9 | | | | | | VEGF | | | | | |
|------|-------|-----|---------|------|------|---------|------|-----|--------|------|-------|--------|
| | CG | | | CM | | | CG | | | CM | | |
| | P | T | % | P | T | % | P | T | % | P | T | % |
| 1 | 80 | 113 | 70,80% | 3233 | 3905 | 82,79% | 43 | 103 | 41,75% | 5140 | 6114 | 84,07% |
| 2 | 190 | 197 | 96,45% | 872 | 3796 | 22,97% | 35 | 81 | 43,21% | 4435 | 4732 | 93,72% |
| 3 | 54 | 73 | 73,97% | 1800 | 2415 | 74,53% | 100 | 116 | 86,21% | 4450 | 4529 | 98,26% |
| 4 | 121 | 126 | 96,03% | 2206 | 2213 | 99,68% | 108 | 113 | 95,58% | 1997 | 2578 | 77,46% |
| 5 | 20 | 166 | 12,05% | 2190 | 3459 | 63,31% | 141 | 149 | 94,63% | 2102 | 5487 | 38,31% |
| 6 | 124 | 133 | 93,23% | 3020 | 3297 | 91,60% | 31 | 53 | 58,49% | 2774 | 4446 | 62,39% |
| 7 | 88 | 92 | 95,65% | 2012 | 2559 | 78,62% | 52 | 73 | 71,23% | 1414 | 4055 | 34,87% |
| 8 | 144 | 144 | 100,00% | 2248 | 2309 | 97,36% | 110 | 128 | 85,94% | 2284 | 4642 | 49,20% |
| 9 | 52 | 90 | 57,78% | 3580 | 3597 | 99,53% | 50 | 70 | 71,43% | 4346 | 8506 | 51,09% |
| 10 | 79 | 84 | 94,05% | 4613 | 4618 | 99,89% | 68 | 74 | 91,89% | 128 | 7441 | 1,72% |
| 11 | 41 | 171 | 23,98% | 5812 | 6982 | 83,24% | 0 | 217 | 0,00% | 0 | 4762 | 0,00% |
| 12 | 104 | 124 | 83,87% | 3834 | 3843 | 99,77% | 136 | 145 | 93,79% | 1037 | 3450 | 30,06% |
| 13 | 74 | 77 | 96,10% | 1355 | 2206 | 61,42% | 85 | 136 | 62,50% | 7138 | 10805 | 66,06% |
| 14 | 137 | 149 | 91,95% | 2181 | 4201 | 51,92% | 91 | 95 | 95,79% | 3258 | 5366 | 60,72% |
| 15 | 90 | 98 | 91,84% | 664 | 3493 | 19,01% | 82 | 86 | 95,35% | 1112 | 5297 | 20,99% |
| 16 | 2 | 44 | 4,55% | 1640 | 2472 | 66,34% | 0 | 30 | 0,00% | 364 | 4822 | 7,55% |
| 17 | 111 | 120 | 92,50% | 4780 | 4842 | 98,72% | 64 | 74 | 86,49% | 734 | 3926 | 18,70% |
| 18 | 97 | 106 | 91,51% | 1141 | 4161 | 27,42% | 60 | 71 | 84,51% | 1618 | 4555 | 35,52% |
| 19 | 36 | 84 | 42,86% | 2280 | 2962 | 76,98% | 0 | 59 | 0,00% | 0 | 7163 | 0,00% |
| 20 | 119 | 130 | 91,54% | 3030 | 3030 | 100,00% | 151 | 160 | 94,38% | 2836 | 2935 | 96,63% |

APÊNDICE G – Parâmetros utilizados no cálculo do percentual global de células positivas ao VEGF e MMP-9 nas LCCG e LPCG

| Caso | LCCG | | | | | | LPCG | | | | | |
|------|-------|------|--------|------|------|--------|-------|------|--------|------|-------|--------|
| | MMP-9 | | | VEGF | | | MMP-9 | | | VEGF | | |
| | P | T | % | P | T | % | P | T | % | P | T | % |
| 1 | 185 | 6450 | 2,87% | 4805 | 5703 | 84,25% | 3313 | 4018 | 82,45% | 5183 | 6217 | 83,37% |
| 2 | 2914 | 5835 | 49,94% | 2645 | 3725 | 71,01% | 1062 | 3993 | 26,60% | 4470 | 4813 | 92,87% |
| 3 | 2904 | 3310 | 87,73% | 2761 | 3881 | 71,14% | 1854 | 2488 | 74,52% | 4550 | 4645 | 97,95% |
| 4 | 459 | 3479 | 13,19% | 1582 | 2059 | 76,83% | 2327 | 2339 | 99,49% | 2105 | 2691 | 78,22% |
| 5 | 767 | 2253 | 34,04% | 83 | 2851 | 2,91% | 2210 | 3625 | 60,97% | 2243 | 5636 | 39,80% |
| 6 | 2540 | 2984 | 85,12% | 3645 | 4751 | 76,72% | 3144 | 3430 | 91,66% | 2805 | 4499 | 62,35% |
| 7 | 2922 | 3252 | 89,85% | 5798 | 5908 | 98,14% | 2100 | 2651 | 79,22% | 1466 | 4128 | 35,51% |
| 8 | 2236 | 3344 | 66,87% | 4725 | 5086 | 92,90% | 2392 | 2453 | 97,51% | 2394 | 4770 | 50,19% |
| 9 | 3695 | 3866 | 95,58% | 1459 | 3192 | 45,71% | 3632 | 3687 | 98,51% | 4396 | 8576 | 51,26% |
| 10 | 4001 | 4294 | 93,18% | 5536 | 6322 | 87,57% | 4692 | 4702 | 99,79% | 196 | 7515 | 2,61% |
| 11 | 2585 | 2751 | 93,97% | 2036 | 2388 | 85,26% | 5853 | 7153 | 81,83% | 0 | 4979 | 0,00% |
| 12 | 3363 | 3718 | 90,45% | 2884 | 3788 | 76,14% | 3938 | 3967 | 99,27% | 1173 | 3595 | 32,63% |
| 13 | 3365 | 3967 | 84,82% | 7154 | 7263 | 98,50% | 1429 | 2283 | 62,59% | 7223 | 10941 | 66,02% |
| 14 | 3372 | 3506 | 96,18% | 1541 | 2373 | 64,94% | 2318 | 4350 | 53,29% | 3349 | 5461 | 61,33% |
| 15 | 1061 | 1286 | 82,50% | 659 | 5588 | 11,79% | 754 | 3591 | 21,00% | 1194 | 5383 | 22,18% |
| 16 | 3591 | 4366 | 82,25% | 2997 | 3320 | 90,27% | 1642 | 2516 | 65,26% | 364 | 4852 | 7,50% |
| 17 | 4403 | 4486 | 98,15% | 3158 | 4268 | 73,99% | 4891 | 4962 | 98,57% | 798 | 4000 | 19,95% |
| 18 | 6233 | 6276 | 99,31% | 0 | 5915 | 0,00% | 1238 | 4267 | 29,01% | 1678 | 4626 | 36,27% |
| 19 | 6367 | 6421 | 99,16% | 4465 | 5059 | 88,26% | 2316 | 3046 | 76,03% | 0 | 7222 | 0,00% |
| 20 | 2696 | 2899 | 93,00% | 2993 | 3853 | 77,68% | 3149 | 3160 | 99,65% | 2987 | 3095 | 96,51% |

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa, UFRN.

**MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

**PARECER Nº 242/2009
(Final)**

| | |
|--|--|
| Prot. nº | 088/09 – CEP – UFRN |
| CAAE | 0093.0.51.000-09 |
| Projeto de Pesquisa | Expressão imuno-histoquímica das proteínas MMP-9 VEGF e FvW em lesões centrais e periféricas de células gigantes |
| Área de Conhecimento | Ciências da Saúde – 402 Departamento de Odontologia – Grupo III |
| Pesquisador Responsável | Roseane de Almeida Freitas |
| Instituição Onde Será Realizado | Universidade Federal do Rio Grande do Norte |
| Instituição Sediadora | Universidade Federal do Rio Grande do Norte |
| Finalidade | Obtenção de grau de mestre |
| Período de realização | Início: outubro de 2009 Término: fevereiro de 2010 |
| Revisão Ética em | 04 de Setembro de 2009 |

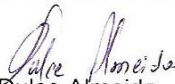
RELATO

Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

Orientações ao Pesquisador: em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.65);
5. os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN (www.etica.ufrn.br).

Natal, 10 de Setembro de 2009.


Dulce Almeida

COORDENADORA DO CEP - UFRN

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)